



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사 학위논문

대사질환을 제어하는
소포체 스트레스 매개 신규 조절자

**Novel molecules in the endoplasmic reticulum stress
signaling pathway for the control of metabolic diseases**

2017년 2월

서울대학교 대학원

약학과 약물학전공

구 자 현

초 록

소포체는 단백질 생합성, 성숙 및 칼슘 항상성을 조절하는 세포소기관이다. 에너지 과잉 섭취 또는 만성적 염증은 소포체에 스트레스를 유발하고 이 것이 지속되어 항상성 균형이 무너지면 대사질환이 발병한다. 이로 인한 임상적 증상은 여러 말초기관에서 각기 다른 형태로 나타나는데, 특히 에너지대사의 주요 기관인 간과 골격근의 질병 및 기능저하가 가장 먼저 발생한다. 그러나 만성 간질환의 결정적 단계인 간섬유화에 대한 소포체 스트레스의 역할이 연구된 바 없으며, 전신 에너지대사 속도를 결정하는 근육의 대사적 유형 변화에 대한 연구 또한 거의 이루어진 바가 없다. 또한 많은 연구가 소포체 스트레스와 각종 대사질환과의 연관성을 뒷받침하지만 이를 매개하여 질병을 제어하는 병리조절분자에 대한 이해는 여전히 부족하다.

본 연구에서는 소포체 스트레스를 매개하는 새로운 병리조절분자를 찾고자 하였고, 이 분자들이 간 및 근육에서 조직 특이적으로 세포의 유형을 전환하여 대사질환을 제어한다는 가설을 제기한다. 이를 구체적으로 증명하기 위하여 1) 간에서는 정상세포의 유형 전환을 중심으로 소포체 스트레스 자극에 의한 섬유화 기전 탐구를, 2) 근육에서는 근세포의 에너지대사 유형 전환을 중심으로 소포체 스트레스와 연계되는 신호매개자에 의한 대사질환 제어 기전 탐구를 연구목표로 제시하였다.

첫째, 간섬유화 환자의 간 조직 분석으로부터 섬유화의 진행에 따라 소포체 스트레스가 증가하고 특히 간섬유화를 일으키는 정상세포 및 주변부에 가중됨을 발견하여 이로부터 정상세포의 활성화에 미치는 소포체 스트레스의 역할을 탐구하였다. GRP78을 세포특이적으로 발현하는 렌티바이러스를 이용하여 정상세포의 소포체 스트레스를 감소시키면 사염화탄소에 의한 간섬유화 유도가 억제되었다. 관련 분자기전으로는 정상세

포의 SMAD2 발현이 소포체 스트레스에 의해 증가하였다. 또한 miR-18a를 통해 SMAD2를 조절하는 hnRNPA1 단백질은 소포체 스트레스에 의해 감소하였다. 이때 hnRNPA1의 Thr51 잔기가 소포체 스트레스 상황에서 활성화되는 PERK(공식명 EIF2AK3)에 의해 인산화되어 분해를 촉진하였고 이 부위의 인산화를 무력화하면 소포체 스트레스에 의한 hnRNPA1의 분해 및 정상세포 활성화 현상이 억제되었다. 렌티바이러스를 이용하여 hnRNPA1을 정상세포 선택적으로 과발현할 경우 간섬유화가 억제되었다. 이러한 결과는 간 섬유화를 억제할 수 있는 새로운 치료 표적으로 소포체 스트레스와 그 하위 조절자인 hnRNPA1를 제시하였다.

둘째, 근세포가 근원세포로부터의 분화과정에서 소포체 스트레스를 수반하는 것을 발견하고 이때 Gα13(공식명 GNA13) 단백질 발현이 증가하는 것을 관찰하여 근육 에너지 대사에 작용하는 Gα13의 역할을 탐구하였다. 당뇨병자와 고지방식을 섭취한 마우스의 근육에서 특히 높은 Gα13 발현이 관찰되었다. 이와 대조적으로 운동을 한 후에는 근육 Gα13 발현이 감소하는 것을 마우스 모델로부터 관찰하였기 때문에 근육 특이적 Gα13 유전자 결손 모델을 구축하여 에너지대사에 미치는 영향을 탐구하였다. 근육에서 Gα13의 결손은 미토콘드리아 신생성과 세포호흡을 촉진하면서 산화대사성 근섬유의 조성비율을 증가시켰다. Gα13과 하위 신호단백질 RhoA가 근섬유 조성을 조절하는 핵심 인자인 NFATc1을 억제하였고, Gα13이 이러한 기전으로 근섬유 조성을 전환함을 생체 내 전기천공법을 이용하여 증명하였다. 이를 매개하는 분자기전으로서 Rock2가 NFATc1의 Ser243 잔기를 인산화시켜 활성을 억제하는 것을 규명하였고, 이 인산화가 운동 후에 감소하거나 비만 마우스나 당뇨병자의 근육에서 정상에 비해 증가하는 현상을 새롭게 발견하였다. 나아가 근육의 Gα13 결손은 전신 에너지대사를 촉진하고 인슐린 감수성을 증가시켜 식

이유도성 비만과 지방간을 억제하였다. 상기 결과는 대사질환 치료제 개발의 새로운 전략으로 Gα13과 연결된 수용체 또는 Rock2의 활성을 저해하는 방법을 제시하였다.

이상을 종합하면 1) 간에서는 PERK에 의한 hnRNPA1의 인산화가 소포체 스트레스 자극에 의한 정상세포 유형 전환과 섬유화를 매개하는 것을, 2) 근육에서는 Rock2에 의한 NFATc1의 인산화가 소포체 자극과 연계되는 신호매개자인 Gα13에 의한 근섬유의 에너지대사 유형 전환을 매개한다는 것을 새롭게 규명하였다. 본 연구의 결과는 소포체 스트레스 및 이를 매개하는 조절자가 에너지 대사의 주요 장기인 간과 근육 생리에 미치는 영향을 파악하였고, 이는 향후 대사질환을 제어하는 약물을 개발하는데 새로운 치료표적으로 활용될 것으로 기대한다.

주요어: 소포체 스트레스, 대사질환, 간섬유화, 비만, 당뇨, 정상세포, 근세포

학번: 2010-21662

목 차

초 록.....	i
목 차.....	iv
List of figures	vii
List of tables	ix
List of abbreviations	x
I. 서 론	1
II. 연구재료 및 방법.....	5
1. 인체 시료분석 및 연구 승인.....	5
2. 동물실험, 유전자 변형 동물 제작 및 연구 승인.....	5
3. 렌티바이러스 매개 세포선택적 유전자 전달	6
4. 면역화학적 단백질 정량 (western blot).....	7
5. RNA 분리 및 정량분석.....	9
6. 조직학적 검사.....	12
7. 하이드록시프롤린 정량분석	13
8. 세포 배양.....	13
9. 세포핵 분획	14
10. 플라스미드와 siRNA 형질도입	14
11. 리포터 유전자 분석	14
12. 면역침강법	15
13. 인산화효소활성시험, 펩타이드 어레이, 이중질량분석.....	15
14. 트레드밀 운동.....	16
15. 전기천공 매개 생체 유전자 전달	16

16. CRISPR 매개 유전자 편집	17
17. 세포호흡 측정	17
18. 체질량 구성 및 에너지대사균형 분석	17
19. 포도당 또는 지방산 흡수속도 측정	17
20. 당 또는 인슐린부하시험	18
21. 인슐린 클램프 (hyperinsulinemic-euglycemic clamp)	18
22. 근육 내 중성지방 정량	19
23. 기타 시약	19
24. 마이크로어레이	19
25. 생물정보학적 분석	20
26. 통계분석	20

III. 연구 결과21

1. 간 정상세포에서의 섬유화 질환 조절자 규명	21
1-1. 소포체 스트레스에 의한 간 내 섬유화 지표 유전자 발현 변화 ..	21
1-2. 정상세포 활성화에 따른 소포체의 변화	23
1-3. 정상세포 특이적 소포체 스트레스 억제에 의한 간섬유화증의 치료	25
1-4. 소포체 스트레스에 의한 Smad2 발현 증가 및 그 역할	27
1-5. 소포체 스트레스에 의한 miRNA 매개 Smad2 조절 기전 ...	32
1-6. 소포체 스트레스에 의한 hnRNPA1 단백질 불안정화	34
1-7. 소포체 스트레스에 의한 hnRNPA1 단백질 안정성 조절 기전	37
1-8. hnRNPA1의 정상세포 특이적 발현에 의한 간섬유화증의 치료	41

2. 근세포의 에너지대사질환 조절자 규명	45
2-1. 근세포 분화에 의한 소포체 스트레스와 이에 따른 Gα13의 발현 조절	45
2-2. 근육조직의 에너지 상태 변화에 의한 Gα13의 발현 변화 ..	47
2-3. 근세포 특이적 Gα13 결손 마우스의 제작	49
2-4. Gα13 결손에 의한 근섬유 조성 전환	51
2-5. Gα13 결손에 의한 미토콘드리아 활성 조절	55
2-6. Gα13에 의한 NFATc1 활성 변화 및 역할	60
2-7. Rock2에 의한 NFATc1의 활성 조절 및 기전	65
2-8. 고지방식이 유도성 비만에 미치는 근육 Gα13의 영향	73
2-9. 식이유도성 당뇨와 인슐린 저항성에 대한 근육 Gα13의 영향 ..	78
IV. 고 찰	83
1-1. 새로운 간 정상세포 활성화 기전 규명	83
1-2. TGFβ 신호전달체계에 관한 본 연구의 의의	84
2-1. 새로운 근세포 유형 전환 기전 규명	85
2-2. Gα 단백질 연구에 관한 본 연구의 의의	87
3. 새로운 인산화 신호전달체계 규명	88
4. 연구결과의 치료적 응용 가능성	90
V. 참고문헌	92
Abstract	101

List of figures

Figure 1. ER stress associates with liver fibrosis	22
Figure 2. ER stress correlates with hepatic stellate cell activation.....	24
Figure 3. ER stress in hepatic stellate cells promotes liver fibrosis	26
Figure 4. Smad2 is overexpressed in fibrotic liver by ER stress	28
Figure 5. Smad2 overexpressed by ER stress induces fibrogenic gene transcription	31
Figure 6. miR-18a dysregulation by ER stress induces Smad2 overexpression··	33
Figure 7. ER stress destabilizes hnRNPA1 in PERK-dependent manner	35
Figure 8. PERK phosphorylates hnRNPA1 on Thr51 for destabilization.....	39
Figure 9. HSC-specific delivery of hnRNPA1 inhibits liver fibrosis progression	42
Figure 10. PERK activity negatively correlates with hnRNPA1 expression in human fibrotic liver.....	44
Figure 11. Ga13 expression increases with ER stress during myoblast differentiation	46
Figure 12. Skeletal muscle Ga13 expression correlates with metabolic alterations	48
Figure 13. Muscle-specific Ga13 knockout animals were generated via Cre-loxP system	50
Figure 14. Loss of Ga13 causes switch of skeletal muscle to oxidative phenotype	53
Figure 15. Loss of Ga13 enhances cellular respiration	56
Figure 16. Analysis of gene expression and morphology of heart tissues from WT and Ga13 MKO mice	59
Figure 17. Ga13 signaling inhibits NFATc1 to determine muscle fiber type	62

Figure 18. Rock2 associates with NFATc1 and inhibits the activity	66
Figure 19. Rock2 phosphorylates NFATc1 at Ser243	69
Figure 20. Ser243 phosphorylation of NFATc1 parallels Gα13 level <i>in vivo</i>	72
Figure 21. Gα13 MKO mice are protected from diet-induced adiposity with increased fatty acid metabolism	75
Figure 22. Skeletal muscle Gα13 deletion inhibits development of diet-induced steatosis in the liver	77
Figure 23. Gα13 MKO mice are protected from diet-induced insulin resistance ·	79
Figure 24. Gα13 ablation improves whole-body insulin sensitivity	82

List of tables

Table 1. Primary antibodies used for immunoassays	8
Table 2. Primers used for qRT-PCR	10

List of abbreviations

2-DG	2-deoxyglucose
α -SMA	α -smooth muscle actin
AA	antimycin A
AMV	avian myeloblastosis virus
ATP	adenosine triphosphate
BFA	brefeldin A
CHOP	CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein
CHX	cycloheximide
CLAMS	comprehensive laboratory animal monitoring system
Con	experimental control
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CTD	C-terminal domain
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ER	endoplasmic reticulum
FCCP	carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
TGF β	transforming growth factor β
G α	G protein subunit α
GIR	glucose infusion rate
GPCR	G protein-coupled receptor
H&E	haematoxylin and eosin
HCV	hepatitis C virus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HFD	high-fat diet

HGP	hepatic glucose production
HOMA-IR	homeostatic model assessment-insulin resistance
HSC	hepatic stellate cell
MHC	myosin heavy chain
MKO	muscle-specific knockout
miRNA	microRNA
ND	normal diet
NHR	NFAT homology region
OCR	oxygen consumption rate
PBA	4-phenylbutiric acid
PERK	protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
RMA	robust multi-array average
Rot	rotenone
SDH	succinate dehydrogenase
S.E.M.	standard error of mean
sgRNA	single guide RNA
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SPF	specific pathogen-free
TA	tibialis anterior
Tun	tunicamycin
Thap	thapsigargin
WT	wild-type
UPR	unfolded protein response

I. 서론

소포체(endoplasmic reticulum)는 단백질을 합성 및 분비, 각종 물질대사, 칼슘 저장 등의 기능을 수행하는 세포소기관이다. 세포에 가해진 염증 유발 신호나 과잉 지질에 의해 미완성(unfolded) 혹은 잘못 완성된(misfolded) 단백질이 축적되면 소포체 스트레스(ER stress)가 유발된다. 이후 과부하를 해소하고 세포 내 항상성을 유지하기 위한 보상적 반응으로 비접힘 단백질반응(unfolded protein response; UPR)이 일어나는데, 이 현상이 만성적으로 지속되면 다양한 질환의 병인으로 작용한다(Lin et al., 2008). 특히 간은 외부 물질을 가장 먼저 인지하고 혈당 및 지질을 각 기관에 공급하는 기관으로, 전신 항상성을 유지하도록 하는 관문 역할을 하기 때문에 반복된 소포체 스트레스에 노출되는 기관이다. 단백질 합성 및 칼슘 항상성이 중요한 근육 역시 소포체의 기능이 중요한 기관이다. 그러나 아직까지 이들 장기의 소포체 스트레스에 의한 질환 및 이를 매개하는 조절자에 대한 이해가 부족하다.

대사질환은 에너지 과잉 섭취에 의해 전신 항상성이 붕괴하여 말초조직에서 각기 다른 형태로 나타나는 질환이다. 전신 대사의 중추적 조절이 주로 간과 근육에서 이루어지기 때문에 대사질환 진행 과정에서 여러 조직 중 간과 근육의 질병 및 기능저하가 가장 먼저 나타난다. 간섬유화(liver fibrosis)는 간에 염증 자극이 지속해서 가해짐에 따라 간에 수축섬유가 과도하게 축적되는 질환이다(Friedman, 2008). 특히 간섬유화는 비만이나 고지혈증에 의해 수반된 지방간으로부터 진행이 가속화되기 때문에 대표적인 간 대사질환으로 여겨진다. 섬유화 단계에서 질환이 더욱 진행되면 간경변으로 악성화되고 이후 간암으로 발전하여 주요한 사망원인으로 작용한다(Pellicoro et al., 2014). 근육은 공급된 에너지를 가장 많이 소모하는 기관으로, 근육의 기능 변화는 다른 조직의 에너지원 공급량에

영향을 미친다. 비만 상황에서는 과잉의 에너지가 장기간 유입되는데, 근육으로 유입된 에너지원이 대사항상성을 유지할 수 없을 정도가 되면 인슐린저항성이 발생하고, 이후 당뇨병으로 발전하여 각종 2차 질환의 원인이 된다(Eckel et al., 2005). 따라서 본 연구에서는 대사 항상성 유지에 핵심적인 역할을 하는 간과 근육을 중심으로 이들 조직에서 발생하는 대사질환의 병리기전을 탐구하였다.

간을 구성하는 약 30%의 비실질세포 중 하나인 간성상세포(hepatic stellate cells)는 평상시 비활성상태로 유지되지만 간 손상 자극을 받을 경우 유형의 전환분화(transdifferentiation)가 일어나 간 조직을 경화시키는 결정적인 역할을 한다(Friedman, 2008; Mederacke et al., 2013). 한편 근육실질세포인 근세포는 높은 대사속도로 인해 전신 대사항상성 유지에 중추적 역할을 하며(DeFronzo and Tripathy, 2009), 특히 대사질환의 전신적 진행 과정 중 근육의 기능저하가 가장 먼저 발생해 나머지 장기의 질환을 유도하기 때문에 대사질환의 발병 및 심화기전을 이해하기 위해 근세포의 생리를 이해하는 것이 필수적이다(Kim et al., 2001). 간성상세포와 근세포는 공통적으로 수축섬유를 많이 발현하는 특성을 보이는데, 대부분의 세포는 매우 적은 양의 수축섬유를 발현하는 것과 대조된다. 뿐만 아니라, 비록 존재 위치 및 형태에 따라 생리적 기능과 병리적 역할이 달라 보이지만, 두 세포는 서로 유사한 발달 및 분화 과정과 단백질 발현 양상을 보인다. 본 연구에서는 간성상세포와 근세포에서 일어나는 신호전달기전을 교차적으로 참고하여 병태생리 연구에 새로운 관점으로 복잡한 분자기전을 이해하고자 하였다.

GRP78은 평상시에 PERK, IRE1, ATF6 막단백질과 결합하여 이들을 억제하는데, 소포체 스트레스 자극이 심화될수록 이들에 결합하는 비율이

감소하고 막단백질이 활성화된다(Ron and Walter, 2007). 소포체 스트레스를 억제하는 샤페론 단백질중 하나인 GRP78 발현을 인위적으로 높인 세포는 소포체 스트레스로부터 보호된다(Kammoun et al., 2009; Xu et al., 2005; Zhang et al., 2009). 본 연구에서 소포체 스트레스가 정상세포 활성화에 미치는 영향을 탐구하기 위해 정상세포에서만 GRP78을 발현하도록 하는 렌티바이러스를 마우스에 주입하여 세포선택적으로 소포체 스트레스를 억제하였다. 소포체 스트레스에 의한 간정상세포 활성화 기전연구로서 mRNA의 안정성을 증가시키거나 miRNA의 성숙을 돕는다고 알려진 RNA결합단백질인 hnRNPA1에 주목하였다(Guil and Cáceres, 2007; Michlewski and Cáceres, 2010). 또한 hnRNPA1의 발현을 소포체 스트레스가 조절함을 발견하고 이를 정상세포 선택적으로 발현시켜 생체 내에서 간 섬유화에 미치는 치료적 효과를 탐구하였다.

근세포가 환경변화를 인지하는 세포표면수용체 중 G단백질 연결수용체(G protein-coupled receptor; GPCR) 군은 800가지 이상의 수용체로 구성되어 있어 그 종류가 가장 많다(Stevens et al., 2013). 이들 수용체는 $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$ 소단위로 이루어진 이질삼합체 G단백질(heterotrimeric G protein)을 통해 세포 내부로 신호를 전달하는데, 이 중 특히 $G\alpha$ 소단위 단백질만 수용체에 직접 결합하여 주요한 신호전달자로 작용한다. G단백질연결수용체의 많은 숫자와 높은 다양성에도 불구하고, $G\alpha$ 단백질의 종류는 16가지에 불과하다(Oldham and Hamm, 2008). 따라서 $G\alpha$ 단백질은 세포 외부의 신호를 세포 내부로 전달하는 핵심적인 분자 스위치로 작동한다. 본 연구에서는 근육조직에서 $G\alpha13$ 이 특이적으로 많이 발현되는 것에 주목하였다. 현재까지 $G\alpha13$ 의 대사적 기능에 대한 연구는 전혀 보고된 바가 없으므로, $G\alpha13$ 이 근육선택적으로 결손된 동물 모델을 구축하여 근섬유의 에너지 대사에 미치는 영향과 대사질환에서의 역할을 탐구하였다.

본 연구에서는 대사질환 진행을 제어하는 소포체 스트레스 매개 신규 조절자를 발굴하였다. 정상세포의 활성화 및 간염유화를 제어하는 핵심 조절자로서 소포체 스트레스와 그 하위신호로 작용하는 hnRNPA1의 생리적 기능을 새롭게 규명하였다(Koo et al., 2016). 또한 근세포에서 소포체 스트레스에 의해 증가하며 비만 및 인슐린저항성을 제어하는 핵심 조절자로서 Gα13를 제시하고, 세포선택적 결손 마우스모델을 중심으로 질환 진행 및 제어기전을 탐구하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 인체 시료분석 및 연구 승인

서울대학교병원운영 서울특별시보라매병원으로부터 HCV 간염 환자의 간조직을 제공받았다. 실험 프로토콜은 헬싱키 선언의 윤리 가이드라인을 준수하였으며 임상시험심사위원회(IRB) 승인을 획득하였다(승인번호 E1505/001-012). 또 다른 군의 환자 시료는 선행연구에서 사용하였던 간염유화 환자 시료를 이용하였다(Kim et al., 2010). 이 시료는 국내 7개 병원으로부터 초음파검사와 조직생검을 통해 간염유화 혹은 간경변으로 진단된 44명의 환자로부터 얻었으며, 임상시험심사위원회 승인을 획득하였다(승인번호 1005/001-003). 해당 시료를 획득할 당시의 임상시험 자료는 ClinicalTrials.gov(미국 국립보건원)에 등록되었다(식별번호 NCT00956098).

2. 동물실험, 유전자 변형 동물 제작 및 연구 승인

실험동물로 사용된 수컷 C57BL/6 마우스(오리엔트바이오) 및 Sprague-Dawley 랫트(샘타코)를 공급받아 1주 이상 사육하여 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 간염유화 유발을 위해 마우스는 옥수수기름에 희석한 사염화탄소(0.6 ml/kg) 혹은 옥수수기름만을 일주일에 2번씩 총 5주 혹은 6주 동안 복강 주사하였다. 생체 내에서 활성화된 간성상세포의 분리에는 사염화탄소를 3주간, 렌티바이러스를 이용한 실험에서는 4주간 주사하였다. 식이유도성 간염유화 모델에서는 마우스에 총 열량의 60%가 지방으로 구성된 고지방식이(D12492, Research Diets)를 20주간 공급한 후 12시간 절식 후에 간조직을 적출하였다. 소포체 스트레스를 유발하기 위해 마우스에 포도당 용액(150 mmol/L)으로 희석한 tunicamycin(2 mg/kg)을 복강 내 주사하고 12-72시간 후에 시료를 얻었다. 야생형 마우스만을 이용한 식이유도성 비만 모델에서는 고지방식이를 13주간 공급하였고 유전

자 변형 동물과 야생형 동물의 비교실험에서는 9주간 공급하였다. 유전자 변형 동물로는 Ckmm-Cre (Jackson Laboratory) 마우스와 $G\alpha 13^{lox/lox}$ (Max Planck Institute의 S. Offermanns 박사 제공) 마우스를 교배하여 근세포 선택적 $G\alpha 13$ 결손 마우스를 얻었고, 이 마우스를 다시 $G\alpha 13^{lox/lox}$ 마우스와 교배하여 얻어진 대조군 야생형($G\alpha 13^{lox/lox}$) 마우스와 $G\alpha 13$ 결손 마우스를 실험에 사용하였다. 유전자변형 동물들은 SPF(specific pathogen-free)시설에서 사육되었으며, 실험에 사용된 모든 동물은 $55\pm 5\%$ 의 습도, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 온도가 유지되며 12시간 주기로 명암이 바뀌는 환경에서 사육되었다. 모든 동물실험은 서울대학교 동물실험윤리위원회 또는 가천대학교 이길여암당뇨연구원 동물실험윤리위원회의 심의 통과 후 해당 규정에 따라 시행하였다.

3. 렌티바이러스 매개 세포선택적 유전자 전달

마우스의 α -SMA(공식명 Acta2) 유전자 전사시작지점 기준 -1.1kb부터 +2.5kb까지 약 3.6kb길이의 프로모터 조각을 pSMP8 플라스미드(Memorial Sloan Kettering Cancer Center의 J.A. Fagin 박사 제공)에서 잘라내었다. 이렇게 얻은 DNA조각은 pCDH-EF1-MCS 플라스미드(System Biosciences)의 EF1 프로모터 부위를 α -SMA 프로모터로 교체하는데 이용하였다. 이후 pCMV-Grp78-Myc-KDEL(Columbia University의 R. Prywes 박사 제공)과 pCMV6-Myc-Flag-hnRNPA1(Origene)의 코드영역(coding region)부위를 잘라 α -SMA 프로모터 다음에 각각 장착하였다. 이 것들을 렌티바이러스 포장 벡터와 함께 HEK293T 세포주에 형질주입하여 바이러스 입자를 생산하였다. 동물실험을 위해 마우스 한 마리당 1.5×10^7 TU의 바이러스를 꼬리 정맥으로 주입하였다. 바이러스 주입 7일 경과 후 실험 목적에 따라 사염화탄소 혹은 tunicamycin을 주사하였다.

4. 면역화학적 단백질 정량 (western blot)

시료마다 동일한 양의 단백질을 도데실황산소듐-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법(SDS-PAGE)으로 분리한 뒤 나이트로셀룰로오스 막(GE healthcare)에 전이시켰다. 5% 탈지유 용액에 1시간 반응시킨 뒤 각 단백질에 대한 1차 항체에 반응시켰다(**Table 1**). Ser243 잔기가 인산화된 NFATc1에 대한 항체는 토끼에 HSPST(pS)PRASITEEC 펩타이드를 항원으로 주사하여 제작하였다(Genscript). 항체의 전체 펩타이드에 대한 인산화 펩타이드의 선택성이 10배 이상 높음을 ELISA를 통해 확인하였다. 1차 항체 반응 이후 HRP-conjugated IgG(Zymed Laboratories)를 한 시간 반응시키고 Amersham ECL western blotting detection reagent(GE Healthcare)로 발색하였다.

Table 1. Primary antibodies used for immunoassays

Antigen	Catalog #	Supplier	Antigen	Catalog #	Supplier
α -SMA	ab7817	Abcam	p-SMAD3	9520	Cell Signaling Technology
DESMIN	ab32362		SMAD3	9523	
G α 13	ab128900		p-Thr	9386	
GRP78	ab21685		MyHC2a	SC-71	DSHB*
HNRNPA1	ab5832		MyHC2b	BF-F3	
MyHC1	ab11083		ATF6	sc-22799	
SEC61A	ab183046		CALR	sc-11398	Santa Cruz
pThr308-AKT	9275	Cell Signaling Technology	CHOP	sc-793	
pSer473-AKT	9271		G α 12	sc-409	
AKT	4685		G α 13	sc-410	
Flag-tag	8146		His-tag	sc-803	
pSer9-GSK3 β	9323		IRE1	sc-20790	
HA-tag	3724		NFATc1	sc-7294	
HNRNPA1	5380		PAI1	sc-8979	
pSer307-IRS1	2381		p-PERK	sc-32577	
p-JNK	9251		PERK	sc-13073	
Lamin A/C	2032		RHOA	sc-418	
Myc-tag	2276		β -actin	a5441	ThermoFisher
pSer235/236-S6	2211		GTP-RHOA	26904	Neweast Biosciences
p-SMAD2	3101		p-PERK	orb6693	Biorbyt
SMAD2	5339		p-Ser	p3430	Sigma-Aldrich

*Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa

5. RNA 분리 및 정량분석

TRIzol(Invitrogen)을 사용하여 세포 및 조직에서 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA중 mRNA는 d(T)₁₆ primer 및 조류골수아구종바이러스(AMV) 역전사효소를 사용하여 cDNA로 변환하였고 이후 각 유전자에 대한 프라이머와 SYBR green dye(Takara)를 사용하여 StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems) 기기로 정량하였다. miRNA는 miScript RT Kit(Qiagen)를 이용하여 cDNA로 변환하였고 이후 각 miRNA에 선택적인 프라이머와 miScript SYBR Green PCR kit(Qiagen)를 사용하여 같은 기기로 정량하였다. 원하는 RNA를 선택적으로 증폭하고 정량하기 위해 각각에 대해 설계한 프라이머의 적합성은 제작 전 Primer-BLAST (미국 국립생물공학정보센터) 프로그램을 이용하여 검증하였다(**Table 2**).

Table 2. Primers used for qRT-PCR

Gene symbol	Forward	Reverse
<i>Human mRNA</i>		
<i>α-SMA</i>	CGTGGCTATTCCTTCGTTAC	TGCCAGCAGACTCCATCC
<i>CHOP</i>	CTGGAAGCCTGGTATGAGGAT	CAGGGTCAAGAGTAGTGAACGT
<i>COL1A1</i>	AACATGACCAAAACCAAAAGTG	CATTGTTTCCTGTGTCTTCTGG
<i>CTGF</i>	CGACTGGAAGACACGTTTGG	AGGCTTGGAGATTTTGGGAG
<i>GRP78</i>	CATCACGCCGTCCTATGTCG	CGTCAAAGACCGTGT TCTCG
<i>SMAD2</i>	CCAGGAATTTGCTGCTCTTC	TCCATAGGGACCACACACAA
<i>SMAD3</i>	GGCTCCCTCATGTCATCTACT	AGTAGGTAAGTGGCTGCAGGT
<i>TGFB1</i>	GGCAGTGGTTGAGCCGTGGA	TGTTGGACAGCTGCTCCACCT
<i>β-actin</i>	GATGAGATTGGCATGGCTTT	GTCACCTTCACCGTTCCAGT
<i>Rat mRNA</i>		
<i>α-SMA</i>	GCTCTGTAAGGCGGGCTTTG	ACGAAGGAATAGCCACGCTCA
<i>Colla1</i>	CTGCATACACAATGGCCTAA	GGGTCCCTCGACTCCTA
<i>Tgfb1</i>	TTGCCCTCTACAACCAACACAA	GGCTTGCGACCCACGTAAGTA
<i>Timp1</i>	TTCGTGGGGACACCAGAAGTC	TATCTGGGACCGCAGGGACTG
<i>Grp78</i>	GGGACAGGAAACAAAACAAAATC	TCTCGGCGTCATTGACCAT
<i>β-actin</i>	TGTACGTAGCCATCCAGGCT	TTCTCCAGGGAGGAAGAGGA
<i>Mouse mRNA</i>		
<i>α-SMA</i>	GGCTCTGGGCTCTGTAAGG	CTCTTGCTCTGGGCTTCATC
<i>Acadl</i>	GCATCAACATCGCAGAGAAA	GGCTATGGCACCGATACACT
<i>Acadm</i>	TTGAGTTGACGGAACAGCAG	CCCCAAAGAATTTGCTTCAA
<i>Acads</i>	TTGCCGAGAAGGAGTTGGTC	AGGTAATCCAAGCCTGCACC
<i>Acox1</i>	ACTACCTGGACAGCCAATGC	CCCGACTGAACCTGGTCATA
<i>Cd36</i>	GATGACGTGGCAAAGAACAG	TCCTCGGGGTCTCTGAGTTAT
<i>Colla1</i>	ACCTGTGTGTTCCCTACTCA	GACTGTTGCCTTCGCCTCTG
<i>Cpt1b</i>	AAGAGACCCCGTAGCCATCAT	GACCCAAAACAGTATCCCAATCA
<i>Gna13</i>	GGAGACTCGAGTGTTCTCTGC	TGGAATGTAATCCGGTACTCCAA
<i>Grp78</i>	TGGTATTCTCCGAGTGACAGC	AGTCTTCAATGTCCGCATCC
<i>Lpl</i>	CCCTACAAAGTGTTCCATTA	CTCGCTCTCGGCCACTGT
<i>mt-Co1</i>	ACTATACTACTAACAGACCG	GGTTCTTTTTTTCCGGAGTA
<i>mt-Co2</i>	AACCATAGGGCACCAATGATAC	GGATGGCATCAGTTTAAAGTCC
<i>Nrf1</i>	GGAGCACTTACTGGAGTCC	CTGTCCGATATCCTGGTGGT

<i>Pdk4</i>	ACCGCATTCTCTACTCGGATG	CCTCCTCGGTCAGAAATCTT
<i>Pgc1a</i>	ACGAGGCCAGTCCTTCCTCC	AGCTCTGAGCAGGGACGTCT
<i>Tfam</i>	GCAAAGGATGATTCGGCTCAGGGAA	CCGGATCGTTTCACACTTCGACGG
<i>Tgfb1</i>	GCCCTGGATACCAACTATTGC	TGTTGGACAGCTGCTCCACCT
<i>Timp1</i>	GGTGTGCACAGTGTTTCCCTGTTT	TCCGTCCACAAACAGTGAGTGTCA
<i>Rna18s5</i>	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>β-actin</i>	CTGAGAGGGAAATCGTGCGT	TGTTGGCATAGAGGTCTTTACGG
<i>miRNA</i>		
pri-miR-17-92	GGTGGCCTGCTATTTCTCTC	GGCCGAAGCTGGAGTTCTAC
miR-18a	TAAGGTGCATCTAGTGCAGATAG	
miR-17	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG	
miR-19a	TGTGCAAATCTATGCAAAACTGA	
miR-19b	TGTGCAAATCCATGCAAAACTGA	
miR-20a	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	
miR-92	TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT	
<i>RNU6B</i>	AATTCGTGAAGCGTTCCATATT	

Universal reverse primer
(Qiagen proprietary information)

6. 조직학적 검사

- 1) Haematoxylin and Eosin 염색: 간, 지방, 이자, 근육조직 검체를 10% formalin에 고정하여 제작한 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 염색하였다.
- 2) 형광면역염색: 탈파라핀화한 파라핀 포매 간조직 절편이나 순간동결 근육조직 절편을 각 1차 항체(Table 1)에 반응시킨 뒤 간조직은 Dylight 488-conjugated goat anti-mouse, Dylight 594-conjugated goat anti-rabbit (Biocare Medical), Rhodamine Red-X-conjugated goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch) 항체로, 근육조직은 AlexaFluor 488-Goat anti Mouse IgG1 (ThermoFisher), AlexaFluor 594-Goat anti Mouse IgM (Jackson ImmunoResearch) 항체로 반응시켜 형광표지하였다. 항체 반응 후에 DAPI가 포함 혹은 불포함된 봉입물질을 넣어 덮개유리를 덮어 밀봉하였다.
- 3) 숙신산탈수소효소(SDH) 염색: 순간동결 근육조직 절편을 0.6 mM nitroterazolium(Sigma-Aldrich)과 50 mM 숙신산소듐이 함유된 0.2 M 인산소듐용액에 반응한 후 덮개유리를 덮어 밀봉하였다.
- 4) Oil Red O 염색: 순간동결 근육조직 절편을 0.5% Oil Red O (Sigma-Aldrich) 이소프로판올 용액을 증류수에 6:4로 희석하여 반응하였다. 염색 후 Haematoxylin으로 대비염색하였다.
- 5) 투과전자현미경 분석: 가자미근(Soleus)을 적출 즉시 Karnovsky 고정액에 고정한 후 1% osmium tetroxide을 함유한 0.05 M 카코딜산소듐 용액에 후고정하였다. 이후 0.5% 아세트산우라닐로 염색하고 에탄올과 프로필렌 옥사이드로 탈수한 뒤 Spurr 수지 안에서 중합하였다. 조직 박절과 관찰은 LIBRA 120 (Zeiss) 기기를 이용하여 서울대학교 농생명과학공동기기원에서 수행하였다.

7. 하이드록시프롤린 정량분석

마우스의 간조직을 증류수에 균질화한 후, 균질액에 농축 염산을 가하여 120°C에서 3시간 동안 가수분해하였다. 가수분해물을 건조하여 hydroxyproline colorimetric assay kit(Biovision)를 이용하여 간조직 내 콜라겐 함량을 측정하였다.

8. 세포 배양

랫트와 마우스의 간성상세포를 분리하기 위해 각 동물을 마취한 상태에서 간조직을 type 1 collagenase(Sigma-Aldrich)를 이용하여 10 ml/min의 유속으로 15분간 관류소화하였다. 소화액을 200g로 2분간 원심분리하여 간세포를 제거한 상층액으로부터 Ficoll/Percoll (GE Healthcare) 1:10 용액을 이용한 밀도구배원심법으로 간성상세포를 최종적으로 분리하였다. 마우스의 근육 위성세포는 기존 문헌(Kim et al., 2016)에 따라 전체의 약 1.5%를 차지하는 CD31⁻CD45.2⁻Sca1⁺VCAM1⁺ 세포를 위성세포로 간주하고 분리하였다. 구체적인 방법으로 마우스 한마리의 뒷다리 근육을 모두 합쳐 type 2 collagenase(Worthington)와 dispase (Life Technologies)로 분해한 후 APC anti-CD31, APC anti-CD45.2, FITC anti-Sca1, PE anti-VCAM1 항체(Biolegend)로 표지하여 FACS Aria 형광세포분류기(BD Biosciences)로 분리하였다. 분리한 간성상세포, 근육 위성세포와 LX-2세포주(Icahn School of Medicine at Mount Sinai의 S.L. Friedmann박사 제공), C2C12세포주(American Type Culture Collection)는 37°C, 5% 이산화탄소가 유지되는 배양기를 이용하여 10% 소태아혈청, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 배양하였다. 위성세포는 이후 소태아혈청 대신 5% 말혈청이 함유된 배지에서, C2C12 세포주는 2% 말혈청이 함유된 배지에서 각각 분화시켰다.

9. 세포핵 분획

세포나 조직 균질액은 10 mM HEPES, 10 mM 염화포타슘, 0.1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 M DTT, 0.5 M PMSF를 함유한 저장성 완충액(pH7.9)에서 부풀도록 하였다. 10분간 얼음 위에서 반응 후 7200g로 5분간 원심분리한 후 상등액을 세포질 분획으로 사용하였다. 침전물에 20 mM HEPES, 400 mM 염화소듐, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF를 함유한 용액(pH7.9)을 넣고 얼음 위에서 30분간 반응하였다. 이후 15,800g로 10분간 원심분리하여 상등액을 핵 분획으로 사용하였다.

10. 플라스미드와 siRNA 형질도입

FuGENE HD 또는 Amaxa Nucleofector(Lonza)를 이용하여 플라스미드 또는 siRNA를 세포 내에 주입하였다. Flag-hnRNPA1 (Origene), PERK 혹은 이것의 비활성변이체 (University of Cambridge의 D. Ron 박사 제공), Flag-Rock2 (Genecopoeia), NFATc1 (La Jolla Institute for Allergy and Immunology의 A. Rao 박사 제공), NFAT 프로모터 발광효소 (Howard Hughes Medical Institute의 G.R. Crabtree 박사 제공) 플라스미드와 함께 pcDNA3.1 공플라스미드를 이에 대한 대조군으로 형질도입 하고 최소 12시간 후에 분석하였다. *Rock1*과 *Rock2*를 억제하기 위한 siRNA는 SMARTpool(Dharmacon)과 해당 대조군 siRNA를 사용하여 형질도입 후 72시간 후에 분석하였다. Gα13QL을 발현하는 아데노바이러스는 LacZ 발현 아데노바이러스를 대조군으로 사용하여 성장배지 하에 첨가하여 최소 12시간 후에 분석하였다.

11. 리포터 유전자 분석

인간 SMAD2 유전자의 프로모터 영역을 가지는 발광효소(luciferase) 플라스미드(Genecopoeia) 혹은 프로모터 영역에 3개의 연속된 NFATc1 결합

부위를 가지는 발광효소 플라스미드를 형질도입하였다. 최소 48시간 후에 세포를 균질화하여 Luciferase Assay System(Promega)으로 추출액 중의 발광효소 활성을 측정하였다.

12. 면역침강법

Flag-hnRNPA1의 인산화 상태와 PERK와의 결합, HA-NFATc1의 인산화 상태와 Rock2와의 결합을 관찰하기 위해 세포 균질액의 단백질 500 µg과 표적 단백질에 대한 항체 1 µg을 4°C에서 12-18시간 반응하였다. 항원-항체 결합체를 단백질 G 아가로오스 비드와 4°C에서 4시간 동안 반응시킨 후 원심분리하여 침전된 비드에 결합한 단백질을 면역화학적 방법으로 관찰하였다.

13. 인산화효소활성시험, 펩타이드 어레이, 이중질량분석

1) 인산화효소활성시험: 인간 재조합 PERK(Sigma) 0.01 µg과 인간 재조합 HNRNPA1(Abcam) 0.1 µg, 혹은 인간 재조합 ROCK2(Abcam) 0.2 µg과 인간 재조합 NFATc1(Sigma) 1 µg을 ³²P-ATP와 함께 2 mM HEPES, 5 mM 염화마그네슘, 1 mM ethylene glycole-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 1 mM DTT, 25 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 단백질분해효소 저해제(Calbiochem)이 포함된 용액에 반응하였다. 경쟁적 올리고펩타이드를 이용한 인산화효소활성시험에서는 500 µg의 8합체 펩타이드(HSPSTSPR)를 ROCK2 0.1 µg, NFATc1 0.5 µg과 함께 반응하였다. 인산화는 SDS-PAGE 이후에 FLA7000 (GE Healthcare) 기기를 이용하여 방사선자동사진법으로 촬영하였다.

2) 펩타이드 어레이: 73개의 인간 HNRNPA1 펩타이드 조각이 교차적으로 배열된 Phosphosite Detector(JPT Peptide Technology)와 10 mg/ml 인간 재조

합 PERK를 이용하여 ^{32}P -ATP와 함께 반응한 후 FLA7000 기기를 이용하여 방사선을 촬영하였다.

3) 이중질량분석: NFATC1 단독으로 혹은 ROCK2와 함께 방사성 ATP로 반응시켰다. 각 반응물로부터 NFATC1의 번역후변형 상태를 Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer(Thermo Scientific)로 측정하여 비교하였다.

14. 트레드밀 운동

시작점에 전기충격그물이 장착된 전동트레드밀(대중기기)로 실험하였다. 수컷 마우스를 처음 30분간 10 m/min의 속도로 달리도록 하다가 16 m/min에 도달할 때까지 매 10분당 2 m/min씩 속도를 증가시켰다. 마우스는 10 m/min으로 하루 1회씩 3일간 적응과정 후에 실험에 사용하였다. 마우스가 20초간 전기충격그물 위에서 저항하며 쉬는 시점을 종료 시점으로 하였다. 운동 전후의 비교 실험에서는 마우스가 지칠 때까지 운동한 후 4시간동안 휴식하도록 하고 근육을 적출하였다. 별도의 실험에서 근육선택적 Gal3 마우스와 야생형 마우스의 최대운동능력을 평가하였다.

15. 전기천공 매개 생체 유전자 전달

마우스를 마취한 후 두 앞정강근에 히알루로니다아제(hyaluronidase)를 40 μg 주입하였다. 3시간 후 shNFATc1(5'-GAGGCTATAAGAGGATGTTGT-3')을 발현하는 플라스미드 80 μg 을 한쪽 앞정강근에 주입하고 반대쪽 앞정강근에는 같은 양의 대조군 shRNA(5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3')를 주입하였다. ECM830 전기천공기(Harvard Apparatus)를 이용하여 즉시 8회 전기 펄스(50 ms, 1 Hz, 62.5 V)를 전달하였다. 14일 후에 근육을 적출하여 분석에 사용하였다.

16. CRISPR 매개 유전자 편집

Gα13 혹은 NFATc1을 인식하는 sgRNA와 Cas9을 발현하는 플라스미드 (Sigma)를 puromycin N-acetyl-transferase를 발현하는 플라스미드와 함께 C2C12 세포주에 형질도입하였다. 3일 후에 puromycin 처치를 통해 형질을 갖지 않는 세포를 사멸시키고 단일 콜로니를 선택하여 유전자 결손을 확인하였다.

17. 세포호흡 측정

산소소모속도를 XFp Extracellular Flux Analyzer(Seahorse Bioscience)로 측정하였다. 실험 1시간 전에 세포를 비완충용액에 배양하였다. 3분마다 3분간 측정한 산소량의 감소 기울기를 Fixed Delta법으로 측정하였다.

18. 체질량 구성 및 에너지대사균형 분석

마우스의 지방량과 제지방량을 ¹H minispec system(LF90II, Bruker Optik)을 이용하여 측정하였다. 고지방식이 섭취 마우스에서 전신 에너지 대사 균형을 분석하기 위해 마우스를 CLAMS(Columbus Instruments)장비 안에서 이틀간의 적응시킨 후 이틀간 분석하였다. 상기 실험은 가천의과대학교 이길여암당뇨연구원에서 수행하였다.

19. 포도당 또는 지방산 흡수속도 측정

1) 포도당 흡수속도 측정: 7주간 고지방식이를 섭취한 마우스와 일반 식이를 섭취한 마우스를 16시간동안 절식시킨 후 골격근을 분리하여 인슐린이 첨가된 DMEM 배지에 15분간 배양하였다. 이후 1 mM 2-deoxyglucose를 첨가하고 15분 더 반응시킨 후 조직을 분쇄하여 Glucose uptake assay kit(Abcam)로 흡수된 2-deoxyglucose의 양을 측정하였다.

2) 지방산 흡수속도 측정: 50주령 마우스로부터 골격근을 분리하여 2% 소혈청알부민과 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ [9,10- ^3H]-palmitate (PerkinElmer), 0.2 mM 지방산성 palmitate가 함유된 DMEM에 즉시 반응하였다. 30분간 30°C에서 반응 후 1 M 수산화포타슘 용액에 넣고 50°C에서 1시간 용해하였다. 이후 신틸레이션계수기로 방사선량을 측정하였다.

20. 당 또는 인슐린부하시험

1) 당부하시험: 7주간 고지방식이를 섭취한 마우스와 일반 식이를 섭취한 마우스를 16시간동안 절식시킨 후 꼬리에서 혈액을 취해 Accu-Check 혈당측정기(Roche)로 혈당을 측정하였다. 이후 포도당(2 g/kg)을 복강 내 주사하고 15, 30, 60, 120분째에 각각 혈당을 측정하였다.

2) 인슐린부하시험: 9주간 고지방식이를 섭취한 마우스와 일반 식이를 섭취한 마우스 8시간 절식시킨 후 인슐린(Humalog, 0.75 U/kg)을 복강 내 주사하고 30, 60, 120분째에 혈당을 측정하였다.

21. 인슐린 클램프 (hyperinsulinemic-euglycemic clamp)

밤새 절식한 마우스에 [3- ^3H]-포도당(PerkinElmer)을 0.05 $\mu\text{Ci/min}$ 의 속도로 2시간동안 주입하여 기저 포도당 흡수속도를 측정하였다. 이후 21.4 mU/kg 인슐린(Eli Lilly)을 초회 주입한 후 분당 3 mU/kg의 인슐린을 일정한 속도로 150분간 주입하면서 혈당을 일정하게 유지하였다. 인슐린 자극 전신 포도당 흡수를 측정하기 위해 [3- ^3H]-포도당을 0.1 $\mu\text{Ci/min}$ 의 속도로 주입하였다. 기저 및 인슐린 자극 전신 포도당 흡수속도는 90-120 분 구간에서 측정하였고 5분 후 2-deoxy-[1- ^{14}C]-포도당(PerkinElmer)을 주입하였다. 150분째에 장판지근을 적출하여 포도당 흡수량을 측정하였다. 인슐린 클램프 실험은 가천대학교 이길여암당뇨연구원에서 수행하였다.

22. 근육 내 중성지방 정량

마우스의 앞정강근을 5% NP-40, 0.1 M 염화포타슘, 1 mM EDTA를 함유한 0.1 M Tris-acetate 완충액(pH 7.4)에서 분쇄하였다. 용액 부피의 6배에 해당하는 양의 클로로포름/메탄올(2:1)을 첨가하고 얼음 위에서 1시간 반응한 후 800g로 3분간 원심분리하였다. 하등액을 추출하여 colorimetric quantification reagent(Sigma)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 중성지방을 측정하였다.

23. 기타 시약

실험에 사용된 tunicamycin, thapsigargin, brefeldin A, A23187, Y-27632 시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

24. 마이크로어레이

마우스의 가자미근에서 RNA를 추출하여 순도와 무결성을 OD 260/280 비율로 1차 검사하고, Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies)를 이용하여 검증하였다. GeneChip WT amplification kit(Affymetrix)를 이용하여 cDNA로 합성한 전사물을 조각낸 다음 TdT효소를 매개로한 GeneChip WT Terminal labeling kit(Affymetrix)를 이용하여 비오틴으로 표지하였다. 약 5.5 mg의 표지된 DNA를 GeneChip Mouse 2.0 ST array(Affymetrix)에 45도에서 16시간동안 보합하였다. 이를 GCS3000 Scanner(Affymetrix)로 촬영하였다. 엑손 발현 양은 RMA법으로 정규화하였다. 통계적 처리와 유전형간 엑손 발현차이를 나타내는 히트맵 시각화 및 이에 대한 위계분석은 R 프로그램(Bioconductor)으로 수행하였다. 마이크로어레이 실험으로부터 얻은 전체 결과는 미국 국립생물공학정보센터의 Gene Expression Omnibus(GEO)에 수납코드 GSE83737로 기탁하였다.

25. 생물정보학적 분석

GEO 데이터세트(GSE29929)에서 유의적으로 변화하는 (2 초과 또는 0.5 미만, $P < .01$) 유전자군을 도출하고, DAVID 6.7 프로그램(미국 국립생물공학정보센터)을 이용하여 유전자 ontology 분석을 통해 TGF β 신호전달 관련 유전자를 대상으로 STRING 9 데이터베이스를 사용하여 유전자 상관관계 네트워크를 도출하였으며, Cytoscape 3 프로그램(미국 국립생물공학정보센터)를 이용하여 시각화하였다. 연구에 이용한 다른 GEO 데이터세트(GSE9103, GSE43346)의 히트맵 시각화 및 이에 대한 위계분석은 R 프로그램으로 수행하였다.

26. 통계분석

면역화학적 분석으로 시각화한 단백질 띠를 Photoshop CC 프로그램(Adobe Systems)으로 정량하였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차로 표기하였으며 그룹간 통계적 유의성은 Student's t-test를 이용하여 $P < .05$ 또는 $P < .01$ 로 분류하였다. Pearson 상관분석방법에 따라 상관계수 r 을 구하고 통계적 유의성을 계산하였다.

III. 연구 결과

1. 간 정상세포에서의 섬유화 질환 조절자 규명

1-1. 소포체 스트레스에 의한 간 내 섬유화 지표 유전자 발현 변화

간섬유화 진행에 미치는 소포체 스트레스의 영향을 알아보기 위하여 간섬유화 환자의 간조직에서 섬유화 정도에 따른 소포체 스트레스의 차이를 분석하였다. 경증 간섬유화 환자에 비하여 중증 환자의 간조직에서 대표적인 소포체 스트레스 지표 유전자인 GRP78과 CHOP(공식명 DDIT3) 발현이 유의적으로 높았다(Figure 1A). 별도의 환자군에서도 섬유화 정도가 심한 간조직에서 GRP78과 CHOP mRNA 발현량이 유의적으로 높았고 특히 CHOP mRNA 발현은 조직학적으로 계량된 간섬유화지수(Ishak fibrosis score)와 양의 상관관계를 보였다(Figure 1B). 간섬유화 자극에 따른 소포체 스트레스의 조직내 발생 위치를 규명하기 위해 사염화탄소를 복강 내 주사한 마우스의 간에서 또 다른 소포체 스트레스 지표인 인산화 PERK를 염색하였다. PERK의 인산화는 사염화탄소에 의해 크게 증가하였으며 특히 정상세포 활성화 지표인 α -SMA와 같은 부위에서 많이 염색되어 소포체 스트레스와 정상세포의 활성화 간에 상관관계가 있음을 시사하였다(Figure 1C).

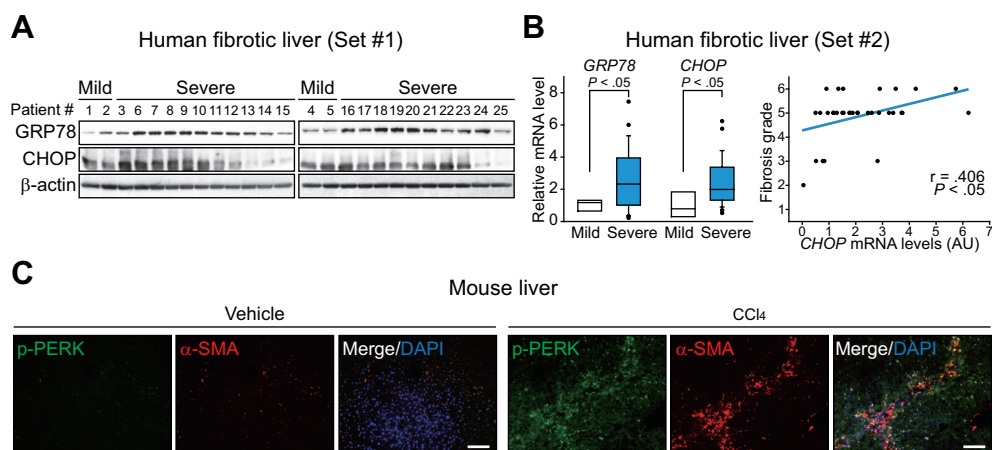


Figure 1. ER (endoplasmic reticulum) stress associates with liver fibrosis

(A) Immunoblotting assays for GRP78 and CHOP in patients with mild fibrosis (Metavir score ≤ 1) or severe fibrosis (Metavir ≥ 2). (B) *Left*, qRT-PCR assays for GRP78 and CHOP in a different set of fibrosis patients (mild, Ishak fibrosis score ≤ 3 ; and severe, Ishak score ≥ 4). *Right*, a positive correlation between CHOP (AU, arbitrary unit) and Ishak score. Data represent the mean \pm S.E.M. (C) Immunostainings on the liver samples of mice treated with CCl₄ twice a week for 5 weeks.

1-2. 정상세포 활성화에 따른 소포체의 변화

랫트에서 분리한 정상세포는 플라스틱 접시에서 배양하면 자발적으로 활성화되는 특성을 보인다(Friedman, 2008). 이를 이용하여 정상세포의 활성화와 소포체 스트레스의 상관관계를 증명하고자 하였다. 세포의 면역색결과 12일간의 배양에 따른 자발적 활성화 과정을 거치면 소포체의 지표단백질인 Calreticulin과 SEC61이 크게 증가하였는데(Figure 2A), 이는 콜라겐 및 싸이토카인의 합성과 분비가 증가하여 소포체의 반응이 항진된 적응적 결과라 생각된다. 정상 혹은 섬유화된 간에서 분리한 정상세포를 비교한 결과, 간섬유화에 따라 생체 내에서 활성화된 정상세포가 대조군에 비해 *Grp78*로 대표되는 소포체 스트레스 지표를 더 많이 발현하였다(Figure 2B). 나아가, 랫트의 정상세포에 소포체 스트레스 유도제인 tunicamycin을 처리하면 *Tgfb1*, α -SMA, *Colla1*, *Timp1* 등 활성화 유전자의 mRNA 발현이 유의적으로 증가하였다(Figure 2C). 소포체 스트레스의 효과를 확인하고 화합물 선택적인 효과의 가능성을 배제하기 위해 다른 소포체 스트레스 유도제인 thapsigargin과 brefeldin A를 처리한 결과도 비슷한 양상을 보였다(Figure 2D). 따라서, 소포체 스트레스는 정상세포 활성화와 상관관계 및 인과관계에 있음을 알 수 있다.

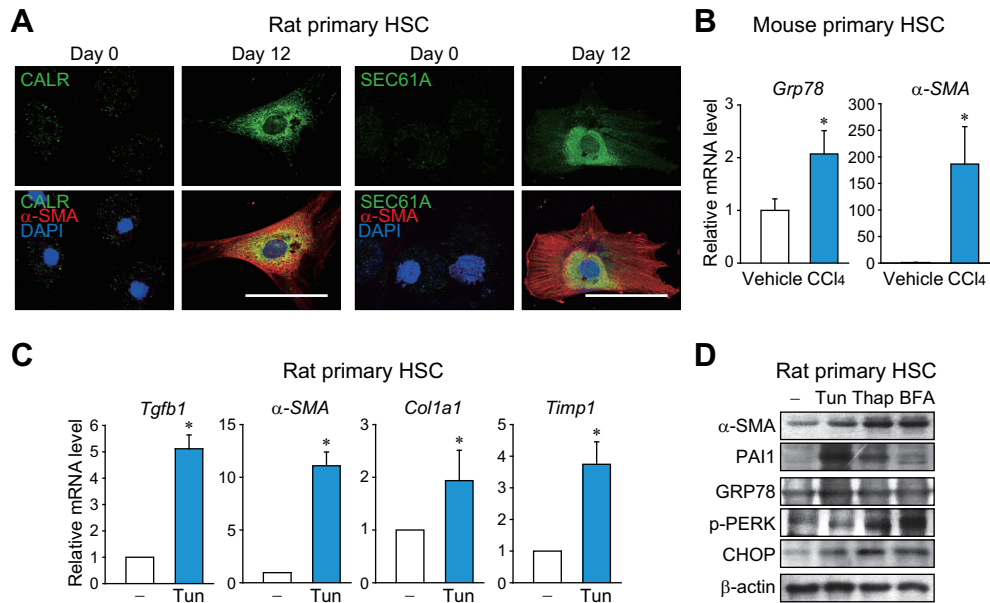


Figure 2. ER stress correlates with hepatic stellate cell (HSC) activation

(A) Confocal imaging for ER in rat primary HSCs. CALR and SEC61A were immunostained as ER markers of freshly isolated (day 0) or culture-activated (day 12) HSCs. Scale bars, 20 μ m. (B) qRT-PCR assays on HSCs isolated from mice treated with vehicle or CCl₄ for 3 weeks (n=3 for each group). (C) qRT-PCR assays on rat primary HSCs treated with tunicamycin (Tun) for 24 h (n=3). (D) Immunoblottings. Rat primary HSCs were treated with tunicamycin (2 μ g/ml), thapsigargin (Thap, 200 nM), or brefeldin A (BFA, 0.1 μ g/ml) for 12 h. For B and C, data represent the mean \pm S.E.M. (significantly different as compared to control, * P < .05).

1-3. 성상세포 특이적 소포체 스트레스 억제에 의한 간섬유화증의 치료

소포체 스트레스에 의한 성상세포 활성화가 갖는 병리적 의미를 탐구하기 위해 α -SMA 유전자 프로모터 뒤에 Grp78 유전자의 단백질 암호화 부위를 갖는 렌티바이러스 벡터를 제작하고, 이를 통해 렌티바이러스를 생산하였다(Figure 3A). 외부에서 전달한 Grp78 유전자가 성상세포 선택적으로 도입되었음을 Grp78에 붙어서 발현하도록 한 Myc 표지가 간세포 사이의 굴주위공간(perisinusoidal space)에 선택적으로 염색되는 것으로 확인하였다. 더불어 해당 조직에서 Myc과 성상세포 표지 단백질인 Desmin 이 같은 위치에서 염색되는 것을 관찰하였다. 간에서 분리한 성상세포를 분리하여 정량적으로 분석함으로써 바이러스에 의한 유전자 도입이 잘 되었음을 다시 검증하였다. 바이러스의 전달 자체는 간조직에 손상을 가하지 않았다. 세포핵을 검정, 세포질을 빨강, 콜라겐 섬유를 파란색으로 염색하는 Masson 삼색염색을 통해 Grp78의 성상세포 선택적 발현은 사염화탄소에 의해 간에 축적되는 섬유의 양을 유의적으로 감소시킴을 발견하였고, 이를 콜라겐 단백질의 양을 지표하는 하이드록시프롤린의 양이 감소하는 것으로부터 확인하였다(Figure 3B). 섬유화 유전자인 Tgfb1, α -SMA, Colla1, Timp1의 mRNA 발현 증가도 Grp78 유전자 전달에 의해 유의적으로 억제되었다(Figure 3C). 이와 유사하게, tunicamycin을 이용한 모델에서도 Grp78의 세포선택적 유전자 전달이 섬유화 인자들의 발현 증가를 억제하였다(Figure 3D). 이를 통해 소포체 스트레스에 의한 간섬유화 과정에서 성상세포가 결정적 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

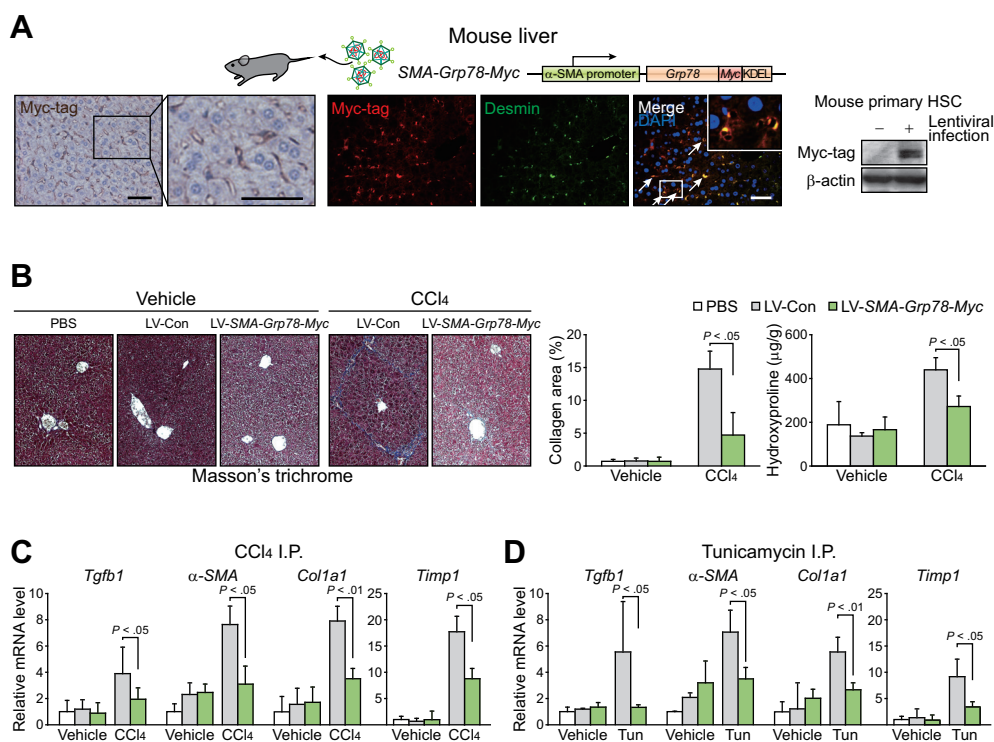


Figure 3. ER stress in hepatic stellate cells promotes liver fibrosis

(A) Lentiviral SMA-Grp78-Myc-KDEL delivery to HSCs in mice. *Left*, liver sections were immunostained against Myc-tag and colored using 3,3'-diaminobenzidine. *Middle*, Myc-tag and Desmin were co-immunostained. Arrows indicate Desmin⁺ cells. Scale bars, 50 μm. *Right*, immunoblottings on primary HSCs isolated after lentiviral injection. (B) Masson's trichrome staining and liver hydroxyproline content. Mice were injected with the lentivirus (or vehicle), and were treated with CCl₄ twice a week for 6 weeks (n=4-8 for each group). (C and D) qRT-PCR assays. (C) The liver samples in panel B were used. (D) After an injection of the lentivirus, the mice were treated with tunicamycin (or vehicle) and were sacrificed after 72 h (n=3-8 for each group). For B-D, data represent the mean ±S.E.M.

1-4. 소포체 스트레스에 의한 Smad2 발현 증가 및 그 역할

SMAD2/3는 정상세포 활성화 자극에 따른 TGF β 신호전달을 매개하여 간섬유화 진행에 핵심적인 역할을 한다(Yoshida and Matsuzaki, 2012). SMAD2/3에 관한 기존 보고의 대부분이 주로 인산화에 의한 활성화 변화에 주목하였다(Massagué, 2012). 그러나 본 연구에서 중증 간섬유화 환자의 간조직에서 경증 환자보다 SMAD2가 유의적으로 많이 발현됨을 발견하였고, 이와는 대조적으로 SMAD3의 발현에는 차이가 없었다(Figure 4A). GEO 데이터베이스(GSE25097)를 이용한 추가적 분석 결과에서도 정상 사람의 간조직에 비교하여 간경화 환자의 간조직에서 SMAD2 발현이 유의적으로 높았고 간섬유화 및 정상세포 활성화 지표인 α -SMA의 mRNA 발현량과 유의적 상관관계를 보였다(Figure 4B). 이에 반해 SMAD3의 발현량은 두 군간 차이를 보이지 않았다. 사염화탄소를 이용하여 간섬유화를 일으킨 마우스의 간에서 분리한 정상세포가 정상 간에서 분리한 정상세포보다 SMAD2를 더 많이 발현하여 간섬유화에 의해 정상세포의 SMAD2가 증가함을 시사하였다(Figure 4C). GRP78 발현량의 중앙값을 기준으로 간섬유화 환자군을 분류하면 GRP78 발현이 낮은 그룹에 비교하여 높은 그룹에서 SMAD2 발현이 유의적으로 높았고, 이는 소포체 스트레스가 SMAD2의 발현을 조절함을 시사하였다(Figure 4D). GEO 데이터베이스(GSE29929)로부터, 마우스의 간에 직접 tunicamycin을 주입하여 소포체 스트레스를 유발하는 경우에도 SMAD2가 증가함을 발견하였다(Figure 4E). 동일한 데이터베이스에서 tunicamycin 처치에 따라 TGF β 신호전달에 관련된 유전자들이 공통적으로 증가하였는데, 이는 소포체 스트레스에 의한 SMAD2 증가로 인해 TGF β 신호가 증폭됨을 시사하였다(Figure 4F).

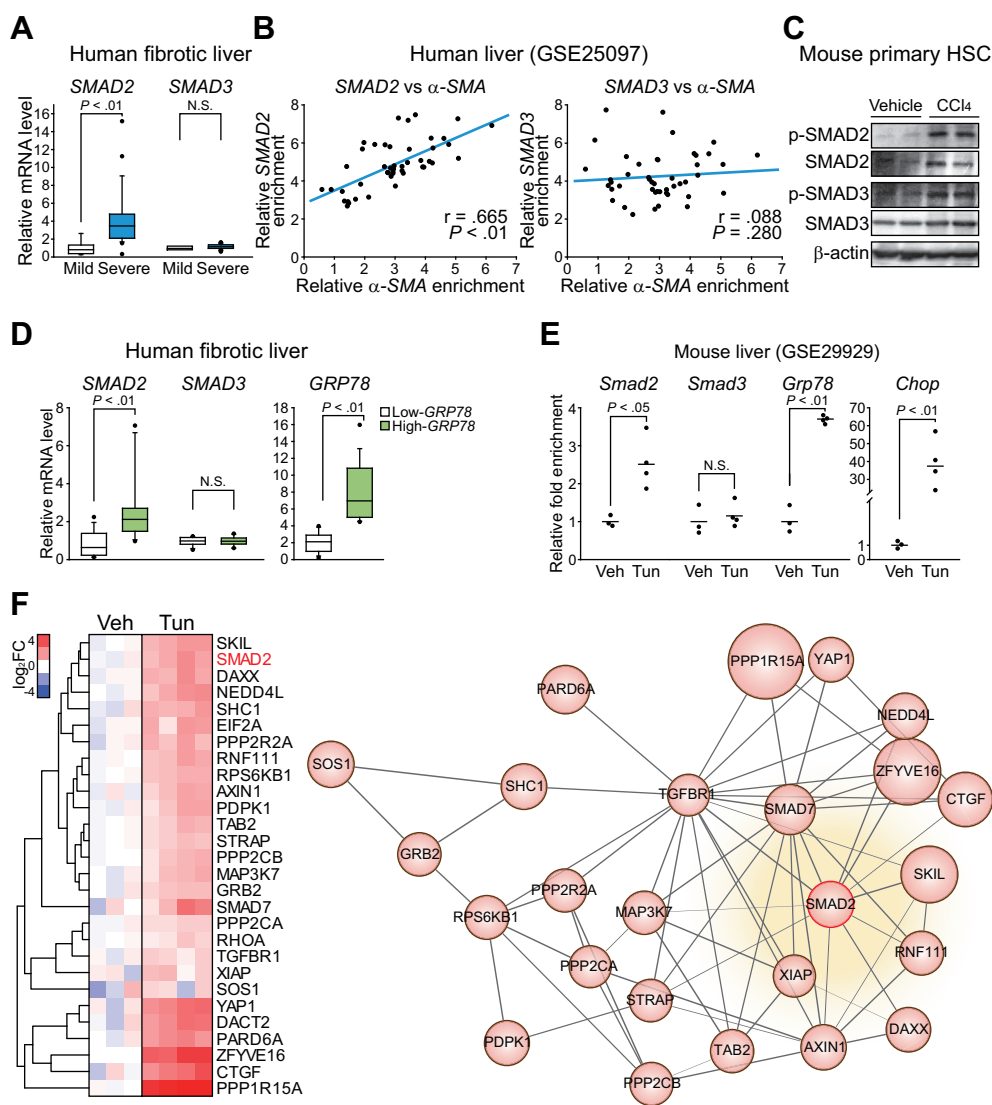


Figure 4. Smad2 is overexpressed in fibrotic liver by ER stress

(A) qRT-PCR assays for SMAD2 or SMAD3 in fibrosis patients. (B) Pearson's correlation analyses in a large cohort of fibrosis patients (GSE25097) ($n=46$). (C) Immunoblottings for SMAD2/3 in the livers or the HSCs from mice treated as in Figure 2B. (D) qRT-PCR assays for *SMAD2*, *SMAD3* or *GRP78* transcripts in liver fibrosis patients grouped into low- and high-*GRP78* cohort ($n=18$ each) using the

median. (**E** and **F**) Transcript levels in mice treated with tunicamycin (Tun) (n=3-4 each). The data were extracted from GSE29929 and reanalyzed. (**E**) Transcript levels of *SMAD2* and *SMAD3*. (**F**) *Left*, a heatmap of tunicamycin-induced gene transcripts in the TGF β -associated pathway. *Right*, an interaction network. Gene interactions were analyzed using STRING database. Node size reflects fold-change as compared to vehicle-treated control. For **A** and **D**, data represent the mean \pm S.E.M. (N.S., not significant).

정상세포에서 소포체 스트레스에 의한 SMAD2 증가효과를 확인하기 위해 정상세포에서 유래한 LX-2 세포주를 이용하여 실험하였다. SMAD2와 SMAD3가 핵 내 이동에 의해 활성화되는 현상이 잘 알려져 있지만, 전체 발현량이 변화한다는 기존 보고는 없었다. LX-2 세포에 tunicamycin을 처리하고 형광면역염색으로 관찰한 결과 소포체 스트레스에 의한 SMAD2의 증가가 핵 내부뿐만 아니라 세포질에서도 관찰되었고, SMAD3는 영향을 받지 않았다(Figure 5A). 랫트에서 분리한 정상세포에서도 같은 결과를 웨스턴 블랏으로 확인하였으며, 특히 tunicamycin에 의한 SMAD2 발현량 증가가 소포체 스트레스 억제 화합물인 4-phenylbutyric acid (PBA) 처리에 의해 감소하여 tunicamycin에 대한 반응이 소포체 스트레스 특이적 현상임을 확인하였다(Figure 5B). 다음으로 SMAD2의 발현을 억제하면 소포체 스트레스에 의한 섬유화 인자 발현이 감소하는 지를 관찰하였고, 그 결과 LX-2 세포에서 siRNA를 이용하여 SMAD2를 억제하면 소포체 스트레스에 의한 α -SMA, COL1A1, CTGF 발현 증가가 억제되었으며 SMAD3를 억제한 경우에는 같은 효과가 관찰되지 않았다(Figure 5C). 상기의 결과들로부터 소포체 스트레스에 의해 정상세포에서 SMAD2가 증가하는 현상이 간섬유화를 촉진시킴을 알 수 있다.

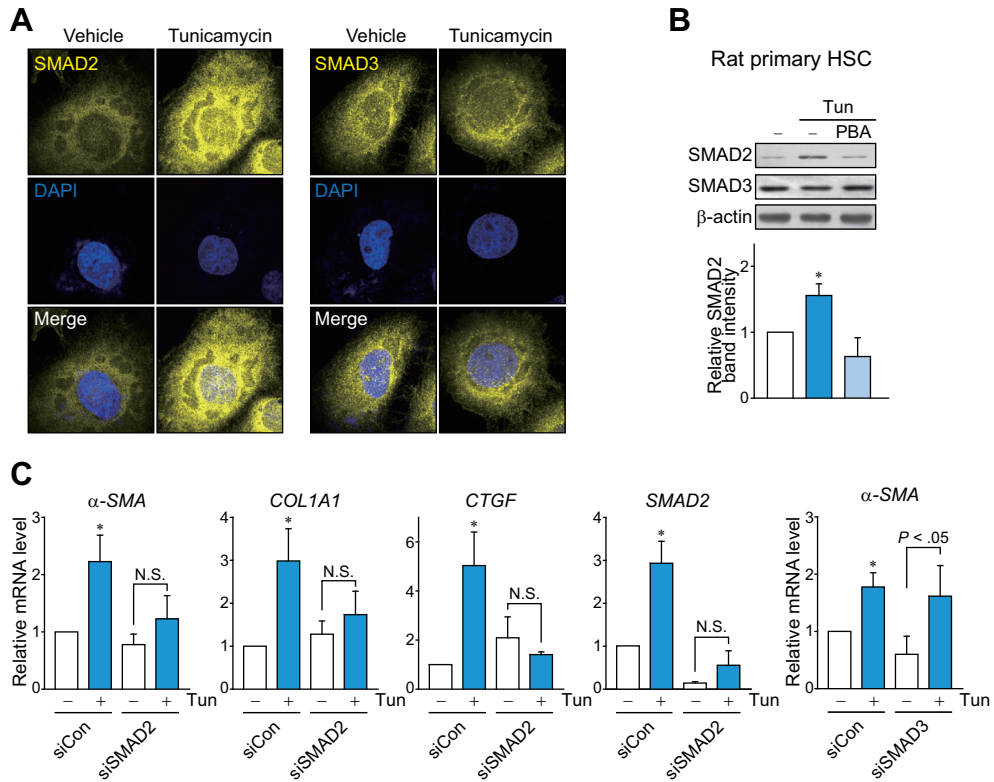


Figure 5. Smad2 overexpressed by ER stress induces fibrogenic gene transcription

(A) Confocal images of SMAD2 or SMAD3. LX-2 cells were treated with 2 μ g/ml tunicamycin for 14 h. (B) Immunoblottings of lysates from rat primary HSCs treated with 200 nM tunicamycin alone or in combination with 3 mM PBA (4-phenylbutyric acid) for 19 h. (C) qRT-PCR assays. LX-2 cells were treated with tunicamycin for 18 h after transfection with control siRNA (siCon), siSMAD2 or siSMAD3. For B and C, data represent the mean \pm S.E.M, from at least 3 separate experiments (significantly different as compared to control, $*P < .05$; N.S., not significant).

1-5. 소포체 스트레스에 의한 miRNA 매개 Smad2 조절 기전

정상세포에서 소포체 스트레스에 의한 SMAD2 증가 원리를 탐구하기 위해 miRNA에 의한 조절현상에 주목하였다. 특히 *SMAD2*의 3' 비해독부위(3' UTR)에 결합할 가능성이 있는 miR-17-92 클러스터에 주목하였는데, 기존 보고에서 이를 구성하는 miR-17, -18a, -19a, -20a, -19b-1, -92-1이 TGF β 체계의 신호전달 요소를 조절할 가능성이 제기되었기 때문이다(Li et al., 2012). 해당 연구에서 입천장중간엽세포에서 miR-18a가 *Smad2*와 결합할 수 있음을 보고하였다. 본 연구에서도 별도의 컴퓨터 예측 알고리즘(Targetscan)을 이용하여 마우스, 랫트, 인간의 SMAD2 mRNA가 miR-18a의 핵심서열부위와 정렬되어 결합할 가능성을 확인하였다(Figure 6A). 랫트에서 분리한 정상세포에서 tunicamycin 처치에 의해 miR-18a의 발현이 유의적으로 감소하였으며 동일한 전구체를 공유하는 다른 miRNA들의 발현은 변하지 않았다(Figure 6B). 섬유화된 간 분리한 활성화된 정상세포 또한 정상 조직에서 분리한 세포에 비해 miR-18a를 적게 발현하였다(Figure 6C). miR-18a의 발현을 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide)를 이용하여 억제하면 SMAD2의 발현 증가와 함께 α -SMA 발현이 증가하여 miR-18a가 소포체 스트레스가 없는 상황에서도 정상세포 활성화를 조절하는 것을 발견하였다(Figure 6D). miRNA는 각각의 pri-miRNA로부터 잘려서 성숙되는 과정을 거쳐 최종적으로 생성된다(Lee et al., 2003). 소포체 스트레스는 miR-18a의 발현을 감소시키는 것과 대조적으로 그 전구체인 pri-miR-18a 발현에는 영향을 미치지 않았다(Figure 6E). 이는 소포체 스트레스에 의한 miR-18a 발현 변화가 전사적 조절이 아닌 전구체로부터의 성숙과정에서 조절됨을 시사하였다.

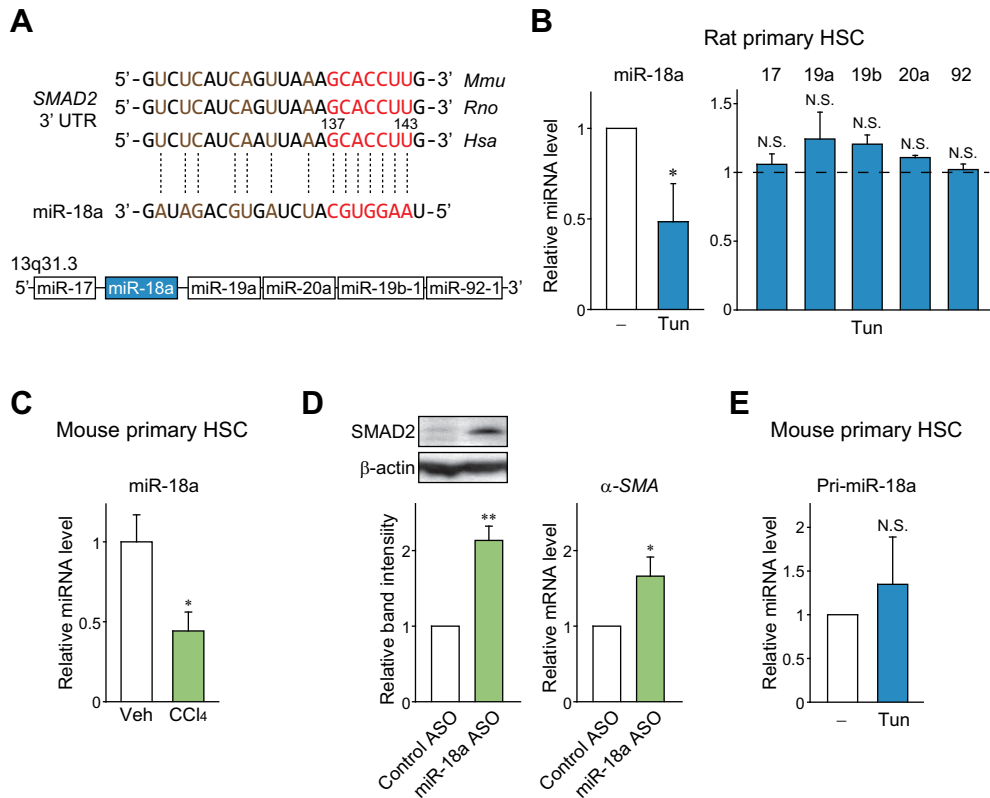


Figure 6. miR-18a dysregulation by ER stress induces Smad2 overexpression

(A) Alignments of miR-18a binding to the 3'-UTRs of Smad2 mRNAs in different species, and the miR-17-92 gene cluster. (B and C) qRT-PCR assays on (B) rat primary HSCs treated with vehicle or tunicamycin (12 h), or (C) in vivo-activated HSCs used in Figure 2B. (D) The effect of miR-18a on the basal expression of SMAD2 and α -SMA. LX-2 cells were transfected with antisense oligonucleotide (ASO) against miR-18a or control (48 h). (E) qRT-PCR assays. The cells were treated with tunicamycin (24 h). For B-F, data represent the mean \pm S.E.M. from at least 3 separate experiments (significantly different as compared to control, * $P < .05$; ** $P < .01$; N.S., not significant).

1-6. 소포체 스트레스에 의한 hnRNPA1 단백질 불안정화

hnRNPA1 단백질이 miR-17-92 클러스터 전구체로부터 다른 miRNA는 조절하지 않으면서 miR-18a의 성숙을 선택적으로 촉진한다는 기존 보고 (Guil and Cáceres, 2007)로부터, 소포체 스트레스에 의한 miR-18a의 조절이 hnRNPA1을 경유하는지를 탐구하였다. 흥미롭게도, 면역염색 결과 tunicamycin을 처리한 LX-2 세포에서 핵 내 hnRNPA1의 양이 감소하였다 (Figure 7A). 또한 같은 현상을 핵과 세포질 분획의 웨스턴 블랏으로부터 확인하였다(Figure 7B). 그러나 핵 외부의 hnRNPA1 양의 증가가 수반되지 않았기 때문에 전체 세포 수준에서의 발현량 변화를 측정하였다. LX-2 세포에서 tunicamycin 처리에 의해 hnRNPA1의 양이 시간에 따라 감소하였으며, 랫트에서 분리한 정상세포에서도 동일한 현상이 나타났고 소포체 스트레스 보호제는 이 현상을 억제하였다(Figure 7C). 소포체 스트레스에 의한 hnRNPA1의 억제효과는 마우스 생체 내에서 활성화된 정상 세포에서도 나타났다(Figure 7D). 나아가 cycloheximide 처리 실험에서 소포체 스트레스가 기발현된 hnRNPA1의 양을 감소시켜 반감기를 약 30% 가량 감소시켰다(Figure 7E). 이러한 결과는 소포체 스트레스가 hnRNPA1의 불안정화를 촉진함을 시사한다. 다음으로 소포체 스트레스의 주요 신호전달체계 중 hnRNPA1의 불안정화를 일으키는 요소를 탐색하였다. PERK의 비활성변이체(dominant negative)는 소포체 스트레스가 hnRNPA1에 미치는 영향을 억제하였으며, IRE1이나 ATF6에 대한 siRNA는 효과를 보이지 않았다(Figure 7F). 이러한 결과는 소포체 스트레스가 PERK 의존적으로 hnRNPA1를 불안정화함을 보여준다.

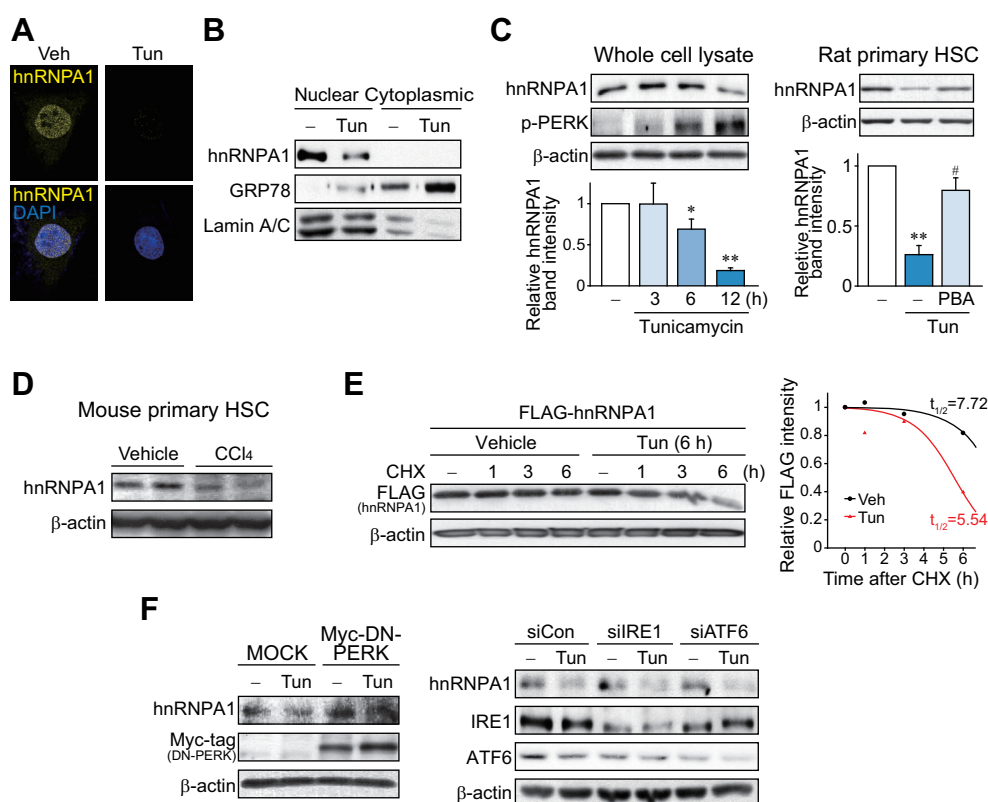


Figure 7. ER stress destabilizes hnRNPA1 in PERK-dependent manner

(A) Confocal imaging for hnRNPA1 in LX-2 cells treated with tunicamycin. (B) Immunoblotting for hnRNPA1 in the nuclear or cytoplasmic fractions. (C) The effect of tunicamycin on hnRNPA1 in the whole cell lysates of LX-2 cells or rat primary HSCs. (D) Immunoblottings on HSCs isolated from mice treated as in Figure 2B. (E) The effect of ER stress on the stability of hnRNPA1. After transfection with FLAG-tagged hnRNPA1 for 24 h, LX-2 cells were treated with tunicamycin (6 h), and continuously exposed to cycloheximide for the indicated times. The expected decay rate of FLAG-hnRNPA1 was calculated using a standard logistic decay equation. (F) The effect of DN-PERK transfection, or knockdown of IRE1 or ATF6 on the decrease of hnRNPA1. The cells were transfected with a kinase-dead mutant

form of PERK or each siRNA, and exposed to tunicamycin (or vehicle). For **C**, data represent the mean \pm S.E.M. from at least 3 separate experiments (significantly different as compared to control, $*P < .05$; $**P < .01$).

1-7. 소포체 스트레스에 의한 hnRNPA1 단백질 안정성 조절 기전

PERK에 의한 hnRNPA1의 조절기전을 탐구하기 위해 두 단백질의 상호작용을 관찰하였다. Tunicamycin 처치에 따라 hnRNPA1에 결합하는 PERK의 양과 PERK에 결합하는 hnRNPA1의 양이 모두 증가함을 발견하여 PERK가 활성화 되면서 hnRNPA1와 물리적으로 상호작용함을 규명하였다(Figure 8A). Tunicamycin을 처치한 세포를 면역염색한 결과 인산화된 PERK의 신호 중 약 2.5%가 hnRNPA1 신호와 같은 위치에서 관찰하여 두 단백질 간의 물리적 결합을 검증하였다(Figure 8B). 반면 대조군에서는 겹치는 신호가 관찰되지 않았다. 나아가 GST-PERK와 His-hnRNPA1 인간 재조합 단백질을 이용한 시험관내 인산화효소활성 측정시험(*in vitro* kinase assay) 결과 PERK가 직접 hnRNPA1을 인산화하는 것 또한 발견하였다(Figure 8C).

PERK에 의한 hnRNPA1의 인산화 부위를 규명하기 위해 이중질량분석(tandem mass spectrometry)을 수행하였으나 이 방법으로 인산화를 측정하는데에는 실패하였다. 다음 방법으로 펩타이드 어레이 방법을 이용하여 인산화 부위를 포함하는 펩타이드 조각을 찾고자 하였다. PERK는 세린-트레오닌 인산화효소이기 때문에, 포착된 신호 중에서 Thr51과 Ser54 잔기를 가지는 펩타이드에 초점을 맞추어 연구를 진행하였다(Figure 8D). 두개의 잔기를 가지는 해당 펩타이드 조각은 선충부터 인간까지 진화적으로 매우 잘 보존되어있기 때문에 생명현상의 조절에 있어 해당 위치의 중요성을 시사하였다(Figure 8E). 효소 특이적 인산화부위를 예측하는 프로그램(GPS 2.1)을 이용한 분석결과 hnRNPA1에 존재하는 3개의 다른 잔기와 함께 Thr51 잔기가 PERK에 의해 인산화될 것으로 예측되었다(Figure 8F). 실제로 면역침강실험에서 소포체 스트레스에 의해 hnRNPA1의 트레오닌 잔기만이 인산화되었기 때문에 이러한 예측이 검증되었다

(Figure 8G). 상기 결과를 통해 소포체 스트레스에 의해 활성화된 PERK는 hnRNPA1의 Thr51 잔기를 인산화시켜 불안정화를 가속한다는 추론을 할 수 있다.

Thr51 인산화가 hnRNPA1의 불안정화 및 정상세포 활성화에 실제 영향을 미치는지를 평가하기 위해 Thr51과 Ser54 잔기의 변이체를 제작하여 기능성 실험을 하였다. Thr51을 알라닌으로 치환시킨 변이체는 tunicamycin이 hnRNPA1을 불안정화시키는 효과를 억제하였으며, Ser54에 대한 알라닌 변이체는 효과를 보이지 않았다(Figure 8H). 나아가, LX-2 세포에서 Thr51-알라닌 변이 hnRNPA1은 tunicamycin 처치에 의한 α -SMA 발현 증가를 억제한 점은 Thr51 인산화가 정상세포 활성화에 미치는 기능적 영향을 시사한다(Figure 8I).

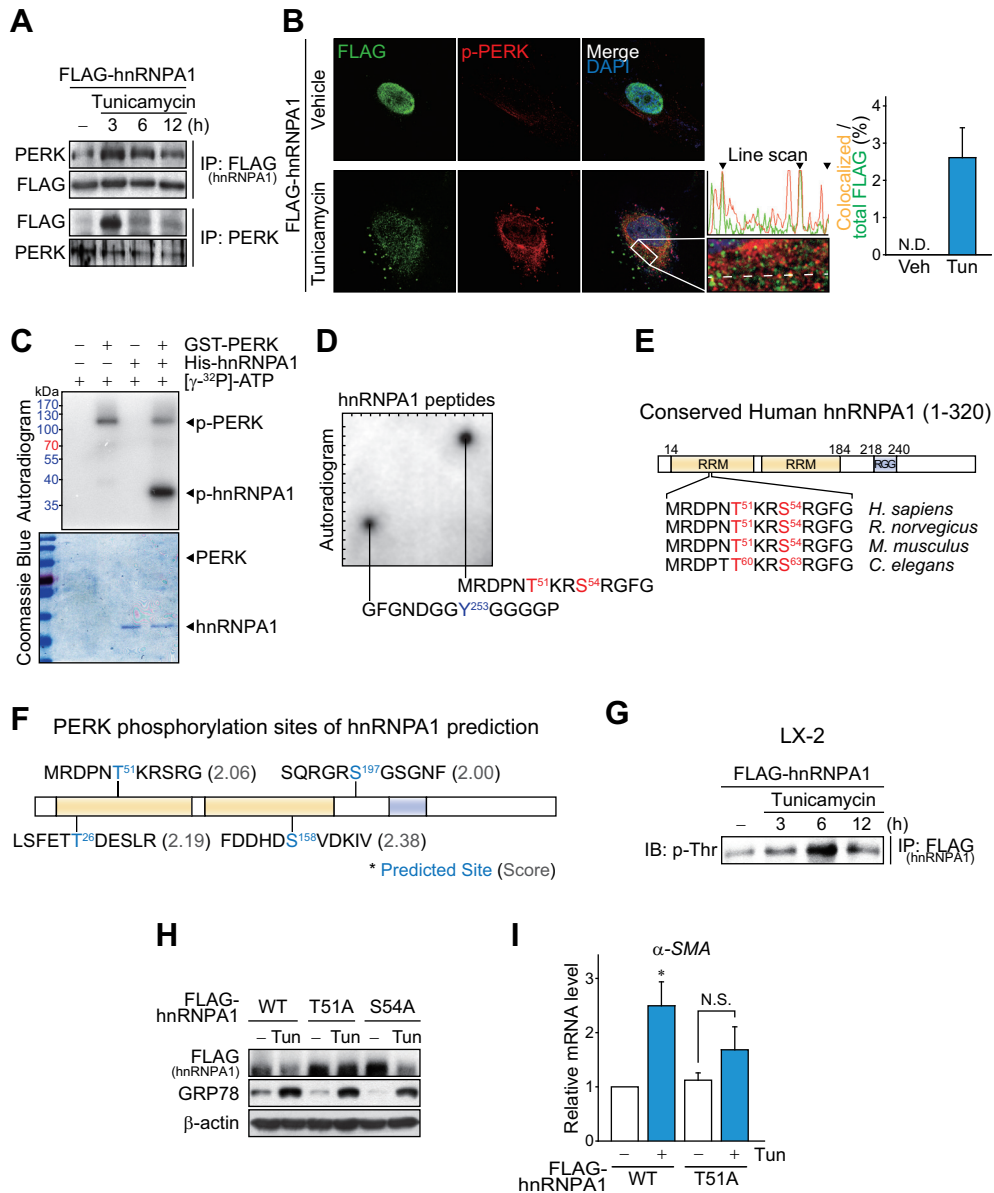


Figure 8. PERK phosphorylates hnRNPA1 on Thr51 for destabilization

(A) Co-immunoprecipitation assays. LX-2 cells were treated with tunicamycin after transfection with FLAG-hnRNPA1. (B) Confocal imaging of hnRNPA1 and p-PERK (tunicamycin treatment for 6 h). Signal intensities of each color were traced

on the dashed line (arrowheads indicate double-positive peaks). Double-positive signals were quantified (n=3 each). N.D., not detected. **(C)** An *in vitro* kinase assay. Recombinant proteins were incubated with ^{32}P -ATP as shown, and phosphorylation was visualized by autoradiography (*Bottom*, Coomassie blue staining). **(D)** Peptide array assays. 73 overlapping peptide fragments corresponding to human hnRNPA1 in an array were subjected to *in vitro* phosphorylation using GST-PERK and ^{32}P -ATP. **(E)** Sequence comparison of a positive hit among different species. RRM, RNA recognition motif; RGG, RGG box motif. **(F)** Sequence-based analysis of the putative PERK-phosphorylation sites on hnRNPA1 using GPS 2.1 software (numbers in parentheses indicate probability scores). Multiple predicted sites including Thr 51 residue were shown. **(G)** The time-course effect of tunicamycin treatment on the threonine phosphorylation of hnRNPA1 in LX-2 cells. The immunoprecipitates used in panel A were immunoblotted for phospho-threonine, sharing the loading control. **(H)** Immunoblottings for FLAG-tagged hnRNPA1. After transfection with FLAG-tagged WT hnRNPA1, or its T51A or S54A mutant, LX-2 cells were treated with tunicamycin (12 h). **(I)** qRT-PCR assays (n=3 each). The cells were treated with tunicamycin (24 h) after WT or T51A mutant hnRNPA1 transfection. Data represent the mean \pm S.E.M. (significantly different as compared to control, $*P < .05$; N.S., not significant).

1-8. hnRNPA1의 정상세포 특이적 발현에 의한 간섬유화증의 치료

상기 결과로부터 발견한 신호전달체계를 간섬유화증의 치료에 활용하기 위하여 α -SMA 프로모터를 이용한 정상세포 선택적 hnRNPA1 유전자 전달 체계를 이용하였다(Figure 9A). 정상세포에서 hnRNPA1를 과발현하면 사염화탄소에 의해 증가하는 간 내 섬유소 축적이 억제되었으며, Masson 삼색염색과 하이드록시프롤린 정량분석에도 같은 현상을 확인하였다(Figure 9B). 이와 유사하게, 정상세포 선택적 hnRNPA1 과발현은 Tgfb1, α -SMA, Col1a1, Timp1 유전자의 mRNA 증가를 억제하였다(Figure 9C).

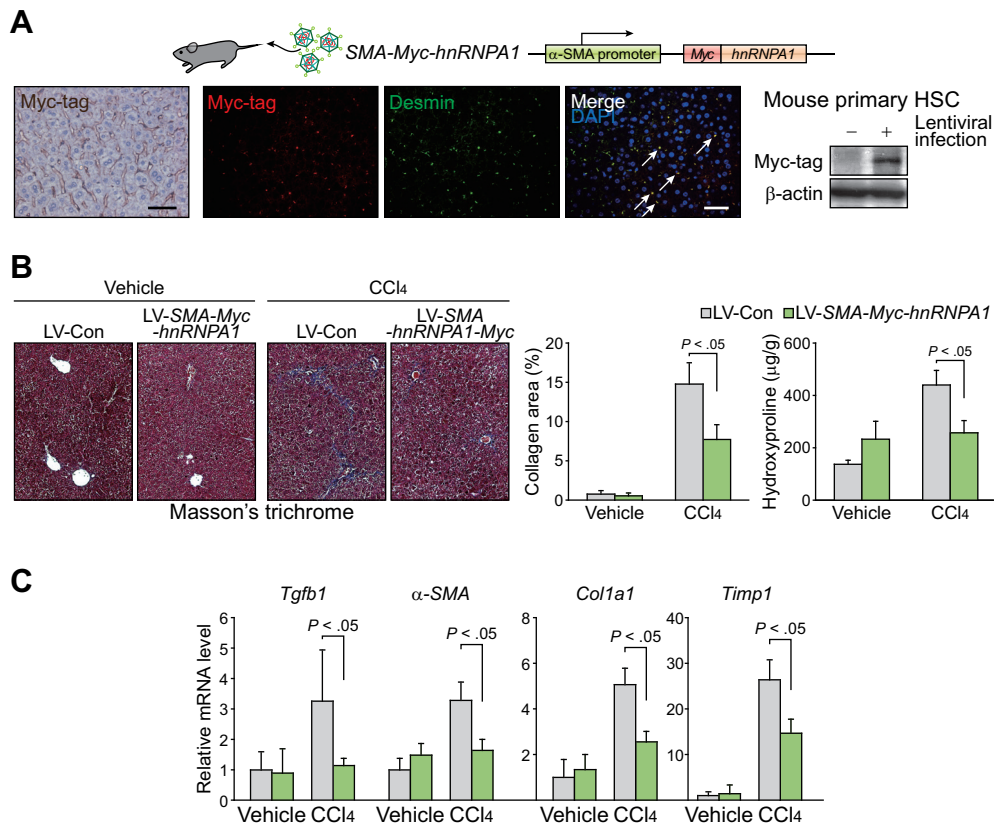


Figure 9. HSC-specific delivery of hnRNA1 inhibits liver fibrosis progression

(A) Verification of *in vivo* gene delivery to hepatic stellate cells using lentiviral particles containing SMA-Myc-hnRNA1 construct. *Left*, liver sections were immunostained against Myc-tag and colored using 3,3'-diaminobenzidine. *Middle*, Myc-tag and Desmin were co-immunostained. Arrows indicate Desmin⁺ cells. Scale bars, 50 μ m. *Right*, immunoblotting for Myc-tagged hnRNA1 in mouse primary HSCs isolated from mice injected with vehicle or the lentiviral construct. (B and C) The effect of specific hnRNA1 delivery to HSCs on liver fibrosis. (B) Masson's trichrome staining and quantification of hydroxyproline content were done in the livers of mice treated with CCl₄ for 6 weeks after the viral infection. (C) qRT-PCR assays (n=4-8 each). For B and C, data represent the mean \pm S.E.M.

앞서 발견한 결과들을 임상적으로 검증하기 위해 간섬유화 환자의 간에서 소포체 스트레스의 지표와 hnRNPA1의 양을 측정하였다. PERK의 인산화와 α -SMA에 대한 이중형광면역염색으로부터 사람의 간에서 간섬유화의 중증도에 따라 소포체 스트레스가 증가하는 것을 관찰하였다. 또한, 중증 환자에서 경증환자에 비해 현저히 낮은 hnRNPA1의 양을 관찰하였기 때문에, hnRNPA1의 감소와 간섬유화의 진행의 연관성을 임상적으로 확인할 수 있었다(**Figure 10A**). 상기 연구결과들을 종합해볼 때, 소포체 스트레스는 정상세포의 PERK를 활성화시키는데, 이를 통해 활성화된 PERK는 Thr51 인산화를 통해 hnRNPA1의 불안정화를 촉진하여 miR-18a의 성숙을 억제하고, 결과적으로 SMAD2 증가에 따른 정상세포 활성화와 그에 따른 간섬유화 진행을 촉진한다(**Figure 10B**).

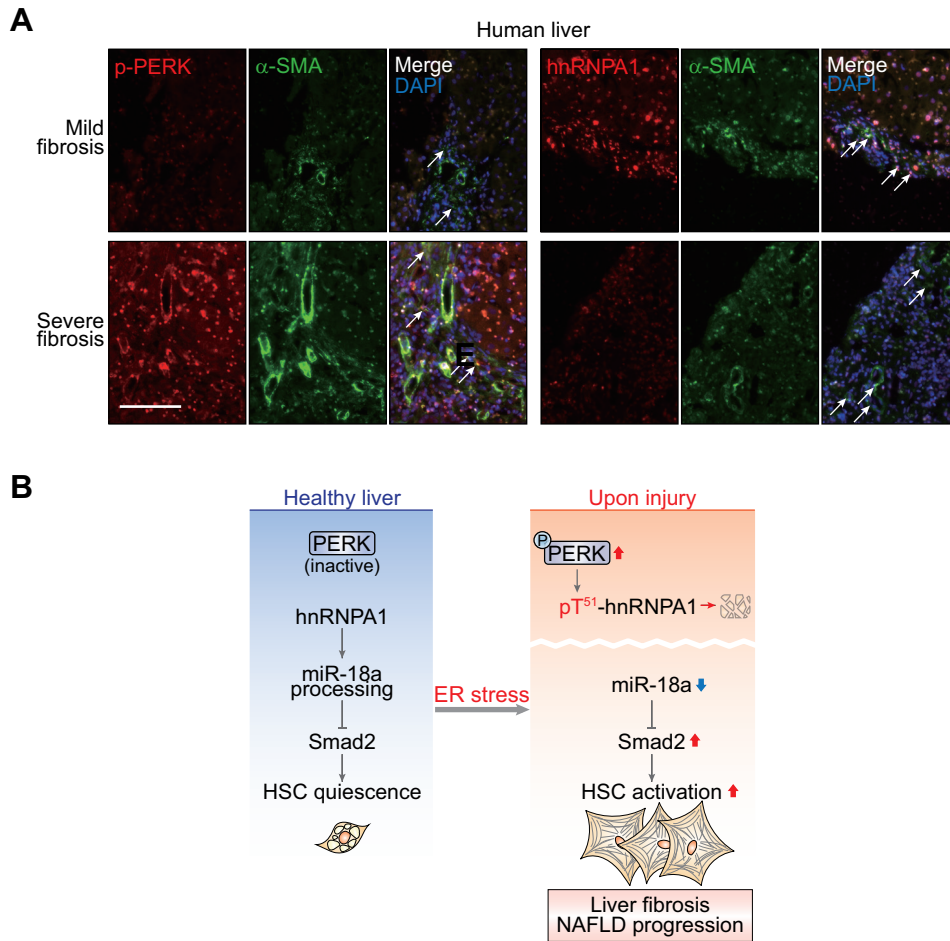


Figure 10. PERK activity negatively correlates with hnRNPA1 expression in human fibrotic liver

(A) Immunostainings of human fibrotic liver sections. Of 13 different samples, representative images were shown (arrows, α -SMA⁺ cells). Scale bar, 100 μ m. (B) A schematic diagram for the mechanism of ER stress-induced HSC activation which is mediated by hnRNPA1 phosphorylation and degradation.

2. 근세포의 에너지대사질환 조절자 규명

2-1. 근세포 분화에 의한 소포체 스트레스와 이에 따른 $G\alpha 13$ 의 발현 조절

골격근의 대사조절 스위치로 작동하는 $G\alpha$ 단백질을 발굴하기 위해 우선 인간 조직의 유전자 발현 데이터베이스(GSE43346)를 분석하였다. 높은 대사활성을 갖는 기관 중 $G\alpha 13$ 이 골격근 특이적으로 분포되어 있음을 발견하였다(Figure 11A). $G\alpha 12$ 는 아미노산 서열상 $G\alpha 13$ 과 유사함에도 불구하고 그러한 분포를 보이지 않았다. RNA-seq 데이터(GSE30611)분석 결과로도 골격근에서 $G\alpha 12$ 에 대비되는 $G\alpha 13$ 특이적 발현 분포를 확인하였다(Figure 11B). 흥미롭게도 이러한 발현 분포는 마우스에서도 비슷하게 관찰되었는데, C57BL/6J 마우스의 여러 기관 중 근육에서 $G\alpha 13$ 의 발현이 가장 높았다(Figure 11C).

C2C12 근원세포주가 근세포로 분화함에 따라 근세포 분화의 지표단백질인 마이오신 H사슬(myosin heavy chain)과 함께 소포체 스트레스 지표단백질인 CHOP과 GRP78, 그리고 인산화 PERK가 증가하였다(Figure 11D). 이와 같은 상황에서 $G\alpha 13$ 의 발현도 함께 증가하는 것을 발견하였다(Figure 11E). 생체 내에서 근세포는 근육줄기세포인 위성세포(satellite cell)로부터 분화되어 근원세포가 되는 과정을 거쳐 최종적으로 성숙 분화한다. 마우스의 뒷다리 골격근으로부터 분리한 위성세포를 근세포로 분화시킴에 따라 소포체 스트레스의 증가와 함께 $G\alpha 13$ 의 증가를 관찰하였다(Figure 11F). 이는 근세포 모델에서 소포체 스트레스에 의한 질환 조절자로서 $G\alpha 13$ 이 작용함을 시사하였다.

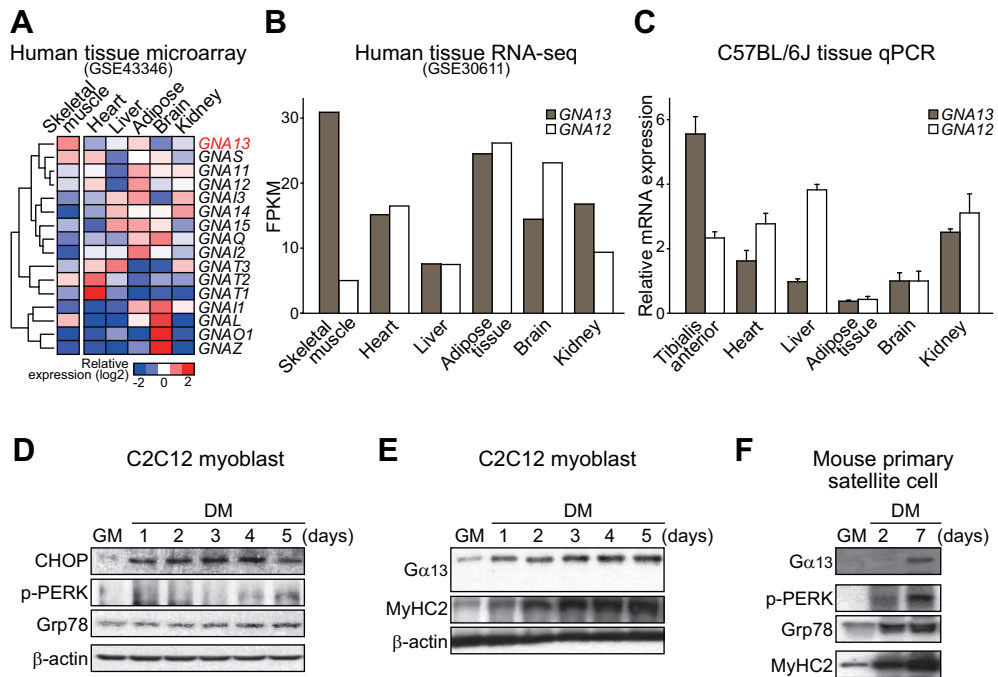


Figure 11. *Ga13* expression increases with ER stress during myoblast differentiation

(A) Tissue distribution of *Ga* (GNA) subunits in microarray data extracted from GSE10347. (B) RNA-sequencing experiments using human tissues. Data from GSE30611 were analyzed. (C) qRT-PCR assays using mouse tissues. C57BL/6J mice were fasted overnight prior to sacrifice (n=3 each). (D-F) Immunoblottings. (D and E) C2C12 myoblasts or (F) mouse primary satellite cells were grown in growth media (GM) or respective differentiation media (DM) for indicated times.

2-2. 근육조직의 에너지 상태 변화에 의한 Gα13의 발현 변화

근육의 대사적 상태 변화에 따른 Gα13의 발현변화를 알아보기 위해 운동에 의해 유도된 에너지 고갈 상태에서 수행한 인간 골격근 마이크로어레이 데이터(GSE9103)로부터 Gα 단백질의 발현을 분석하였고, 그 중 Gα13의 발현이 운동에 의해 감소하는 것을 발견하였다(**Figure 12A**). 또한 마우스를 지칠 때까지 운동시킨 후 3시간 뒤에 단백질 발현을 분석한 결과 동일하게 Gα13의 감소가 관찰되었다(**Figure 12B**). 에너지대사 측면에서 운동의 대척적 환경인 고지방식이(high-fat diet; HFD)를 먹인 쥐의 근육에서는 Gα13의 양이 반대로 증가하였으며, Gα13에 의해 활성화되는 하위 신호인 RhoA의 활성화도 증가하였다(**Figure 12C**). 사람의 근육을 분석한 결과에서도 유사하게 2형 당뇨병 환자의 골격근이 건강한 사람의 골격근보다 Gα13을 많이 발현하였다(**Figure 12D**).

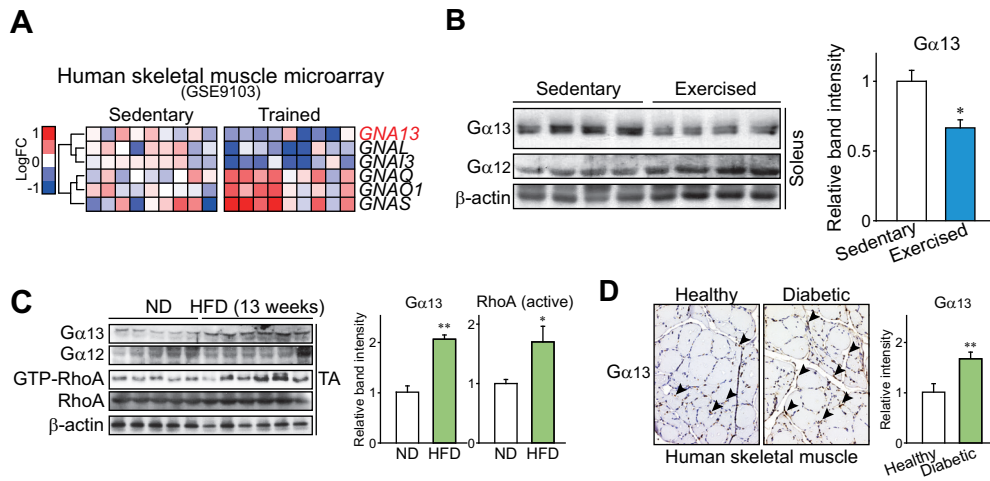


Figure 12. *Gα13* expression in skeletal muscle correlates with alterations of metabolic condition

(A) Relative expression of *Gα* subunits in human quadriceps before or after exercise. The data were extracted from GSE9103. (B) *Gα13* protein levels in soleus muscle before and 4 h after 1 h exercise (n=4 each). (C) Immunoblottings for *Gα13* and GTP-bound RhoA in tibialis anterior (TA) muscles from mice fed on a normal (ND) or high-fat diet (HFD) for 13 weeks (n=5-6 each). (D) Immunostaining for *Gα13* in skeletal muscles of a healthy volunteer or a diabetic patient. For B-D, the data are shown as the mean \pm S.E.M. (significantly different as compared to control, * $P < .05$; ** $P < .01$).

2-3. 근세포 특이적 $G\alpha 13$ 결손 마우스의 제작

골격근 생리에 미치는 $G\alpha 13$ 의 역할을 탐구하기 위해 유전자 결손 모델을 도입하였다. 전신적 $G\alpha 13$ 결손은 배아단계에서 결함을 일으켜 사멸을 유발하기 때문에(Offermanns, 1997), 크레아틴인산화효소(creatine kinase; Ckmm) 유전자 프로모터를 이용한 Cre-loxP 체계를 통해 골격근 선택적으로 $G\alpha 13$ 이 결손된($G\alpha 13$ MKO; $G\alpha 13$ muscle-specific knockout) 마우스를 제작하여 연구에 활용하였다. $G\alpha 13$ 근처에 loxP 서열의 삽입은 $G\alpha 13$ 의 발현이나 다른 표현형에 변화를 주지 않았기 때문에, Cre 유전자가 검출되지 않고 $G\alpha 13^{flox/flox}$ 유전형만을 가지는 야생형(wild-type) 마우스를 대조군으로 사용하였다(Figure 13A,B). 골격근 선택적 $G\alpha 13$ 결손 마우스는 멘델 비율로 태어났고 뚜렷한 형태학적 결함 없이 1년 이상 생존하였다. $G\alpha 13$ MKO 마우스의 앞정강근(전경골근; tibialis anterior) 및 가자미근(soleus)에서 $G\alpha 13$ 의 mRNA와 단백질 발현이 야생형 마우스에 비해 현저히 낮고 간, 지방, 뇌, 신장 등 다른 기관에서는 비슷한 수준으로 발현되어 예상대로 근세포 선택적 유전자 결손을 보였다(Figure 13C,D).

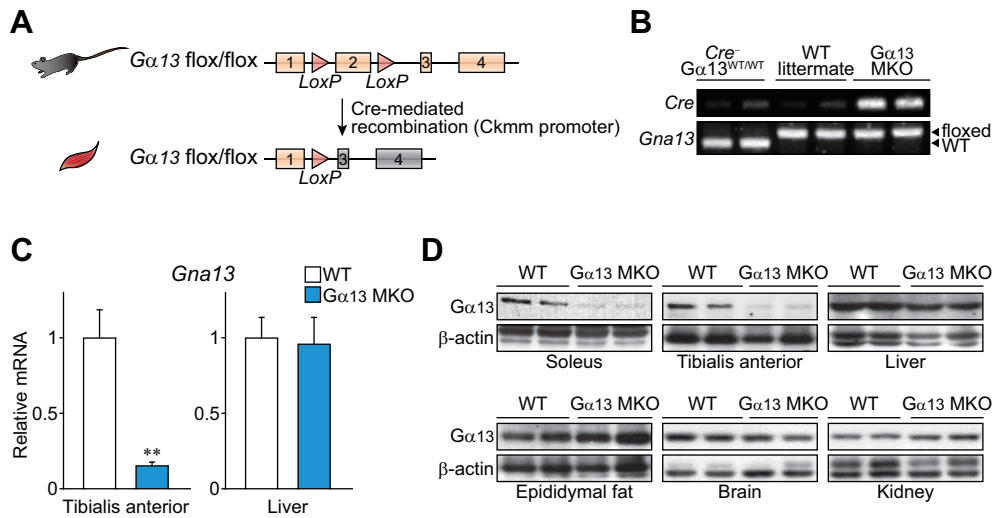


Figure 13. Muscle-specific *Gα13* knockout animals were generated via Cre-loxP system

(A) Generation of muscle-specific *Gα13* knockout mice via Cre-lox recombination. (B) PCR analysis using tail genomic DNA from wild-type C57BL/6 mice, wild-type littermates (*Gα13*flox/flox, WT) and *Gα13* MKO (Ckmm-Cre⁺; *Gα13*flox/flox) mice. (C and D) (C) qPCR analyses of three samples each and (D) immunoblottings for *Gα13* in muscles and liver. For C, the data are shown as the mean \pm S.E.M. (significantly different as compared to WT, ***P* < .01).

2-4. Gα13 결손에 의한 근섬유 조성 전환

포유류의 근섬유는 발현하는 마이오신 H사슬의 종류에 따라 1, 2a, 2x, 2b형으로 세분화되는데(Schiaffino and Reggiani, 2011), 이 중 1형과 2a형은 미토콘드리아 함량이 높고 산화적 대사능이 높아 산화근섬유로 분류되며 산화/비산화 근섬유의 조합비율이 근육의 대사적 특성을 결정한다. Gα13의 결손이 근육에 미치는 영향을 평가하기 위해 Gα13 MKO 마우스와 야생형 마우스에서 엑손 마이크로어레이를 이용하여 전장 전사체의 변화를 관찰한 결과 2b형 비산화근섬유의 분자적 지표인 Myh4를 이루는 엑손이 Gα13 MKO 마우스에서 유의적으로 적게 발현되었고, 이는 Gα13의 결손이 근섬유의 산화성 표현형으로 전환시킴을 시사하였다(Figure 14A). 동시에 육안으로 관찰했을 때 유전자 결손 동물의 근육이 더 붉은 색을 띠었는데 이는 산화적 근육의 특징이다(Figure 14B). 개별적인 근섬유의 크기는 유전자 결손 동물과 대조군이 비슷하였으며 근육의 무게도 차이를 보이지 않았다(Figure 14C). 조직의 면역염색을 통해 앞정강근에서 1형 및 2a형 산화근섬유의 비율이 크게 증가하면서 2b형 근섬유의 감소를 수반하였다(Figure 14D). 이와 같은 결과를 숙신산탈수소효소(succinate dehydrogenase; SDH) 활성 염색으로도 확인하였다(Figure 14E). 이러한 근섬유의 전환은 가자미근과 장딴지근(비복근; gastrocnemius) 등 다른 부위의 근육에서도 관찰되었다.

산화근섬유의 비율이 높은 조성을 갖는 근육은 피로에 대한 저항성을 가진다. Gα13 MKO 마우스는 훈련 없이도 야생형에 비해 높은 운동 저항성을 보였으며, 지칠 때까지 각각 20%와 30% 증가된 운동 시간과 거리를 기록하였다(Figure 14F). 전자현미경을 이용한 관찰결과 Gα13 MKO 마우스가 근원섬유간, 근섬유막하 미토콘드리아 크기가 더 크고 진한 소견을 보였다(Figure 14G). 특히 근원섬유간 미토콘드리아의 양이 Gα13 MKO

마우스의 근육에서 더 많았는데, 이와 유사하게 $G\alpha 13$ MKO 마우스의 장딴지근에서 미토콘드리아 DNA 함량이 2배가량 많았다(**Figure 14H**). 미토콘드리아의 기능상 지표를 RNA로써 확인한 결과 *PGC1 α* 와 *Nrf1*를 포함한 미토콘드리아 신생성 촉진 유전자가 $G\alpha 13$ MKO 마우스에서 대조군에 비해 유의적으로 많이 발현되었다(**Figure 14I**). 나아가 미토콘드리아의 산화적 인산화에 관여하는 각종 에너지 생산 단백질의 유전자 발현 또한 대조군보다 많이 발현되었다. 상기 결과는 $G\alpha 13$ 의 결손이 근육의 특성을 지구력운동 유사적인 방향으로 전환시켰음을 의미한다.

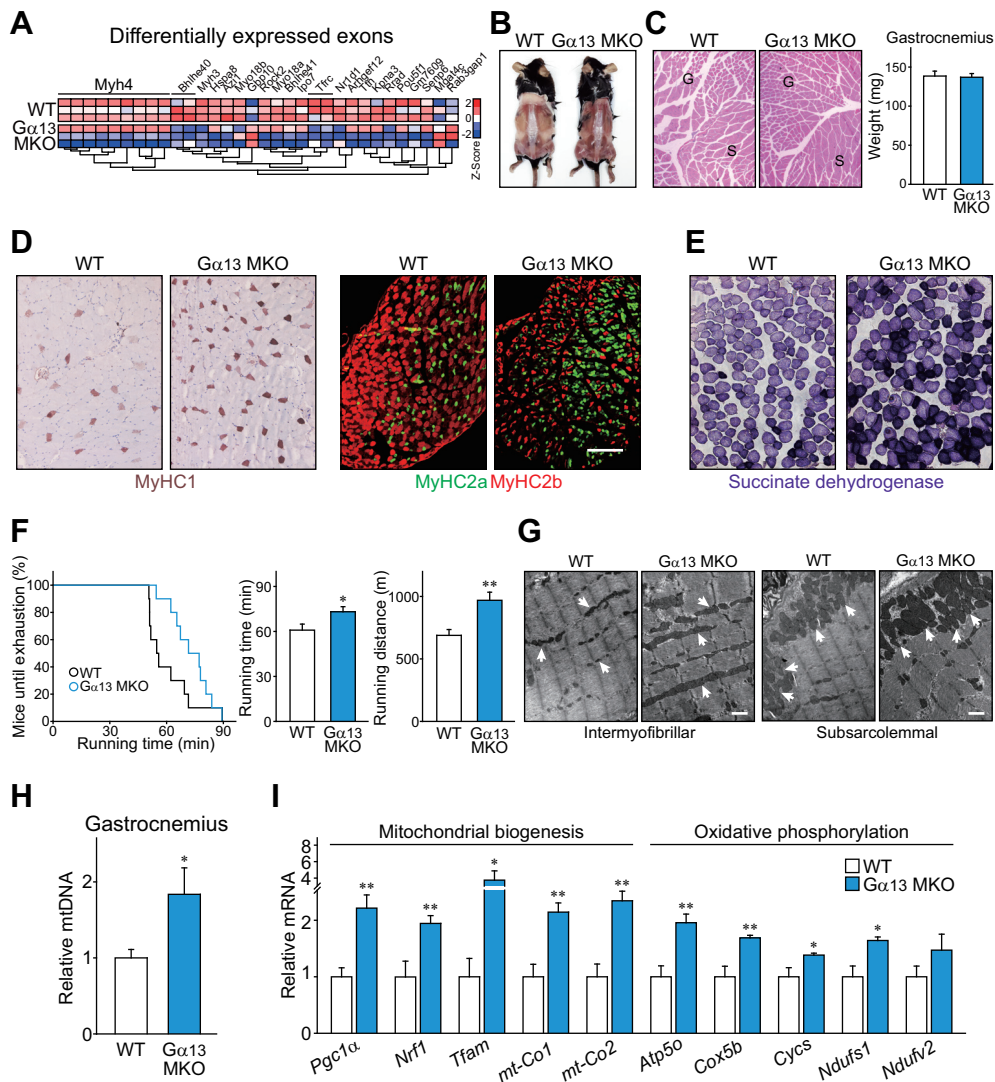


Figure 14. Loss of Ga13 causes switch of skeletal muscle to oxidative phenotype

(A) Global gene expression analysis. RNA was isolated from soleus muscles of mice with indicated genotypes and was hybridized to Affymetrix Exon Arrays. (B) Dorsal view of skinned WT or $\alpha 13$ MKO mice at 35 weeks after birth. (C) Hematoxylin and eosin staining (*Left*) and wet weight (*Right*) of hindlimb muscles. G, gastrocnemius; S, soleus. (D) Representative immunohistochemistry of TA muscles

from 12-week-old WT or Gα13 MKO mice using specific antibodies for each of the fiber types (n=3). **(E)** Representative histochemical staining of succinate dehydrogenase (SDH) enzymatic activity in TA muscles (n=3-4 per genotype). **(F)** Endurance capacity of Gα13 MKO mice compared to WT mice. Percentage of mice running over time (*Left*) and maximum running time (*Middle*) and distance (*Right*) in endurance exercise test are shown (n=10 per genotype). **(G)** Transmission electron micrographs in longitudinal sections of soleus muscle. Arrows point to mitochondria. Scale bars, 1 μm. **(H)** Quantification of mitochondrial DNA content (n=3 each). Copy number ratio of mitochondrial to nuclear DNA was measured by qPCR analysis for *Mt-co2* and *Nrip1* using total DNA isolated from gastrocnemius muscle. **(I)** qRT-PCR assays. Tibialis anterior muscles were prepared from mice that had been fasted overnight (n=6-8 each). For **F**, **H** and **I**, the data are shown as the mean ±S.E.M. (significantly different as compared to WT, **P* < .05; ***P* < .01).

2-5. Gα13 결손에 의한 미토콘드리아 활성 조절

Gα13 결손에 따른 근육의 운동유사적 유형변화와 이에 따른 미토콘드리아의 활성 증가를 세포 수준에서 기능적으로 증명하고자 하였다. 미토콘드리아는 산화적인산화 과정을 통해 ATP를 생산하는 세포소기관이며 세포질에서의 ATP 생산과정과는 대조적으로 산소를 소모하기 때문에 미토콘드리아의 연료 소모와 ATP 생산에 대한 기능적 분석방법으로 세포 산소 소모량을 측정하는 방법이 가장 표준적인 방법으로 이용된다 (Szendroedi et al., 2011). 근육조직에 존재하는 여러 비실질세포(혈관내피세포, 지방세포, 면역세포 등)의 역할을 배제하고 실질세포인 근세포의 기능만을 측정하기 위해 마우스의 뒷다리로부터 위성세포를 분리하여 근관(myotube)으로 완전히 분화시켜 사용하였다(Figure 15A). Gα13 MKO 마우스로부터 분리한 위성세포는 야생형 마우스로 분리한 세포와 비슷한 성장 및 분화 양상을 보였다(Figure 15B). 7일간의 분화과정 후에 관찰한 결과 대조군과는 달리 Gα13 MKO 마우스로부터 분리한 세포는 Gα13을 발현하지 않았다(Figure 15C). Gα13이 결손된 근관은 기저상태에서 유의적으로 높은 산소 소모량을 보였다. Oligomycin을 처리하여 ATP 생합성을 완전히 억제했을 때도 이 차이를 유지하였기 때문에 ATP 생산 없이도 기초대사량이 높은 운동유사효과를 확인하였다. 나아가 ATP 생합성과 산소소모의 속도결정단계인 ATP 합성효소를 우회하도록 FCCP를 처리하여 최대호흡을 측정했을 때도 Gα13이 결손된 세포가 유의적으로 높은 산소 소모량을 기록하였기 때문에 결과적으로 기저, 짝폴림(uncoupled), 최대 호흡상태에서 모두 2배가량 높은 산소소모량을 보였다(Figure 15D). 상기의 결과는 Gα13의 결손이 산화근섬유의 양을 늘려 근육의 대사활성을 증가시킨다는 본 연구의 발견을 뒷받침한다.

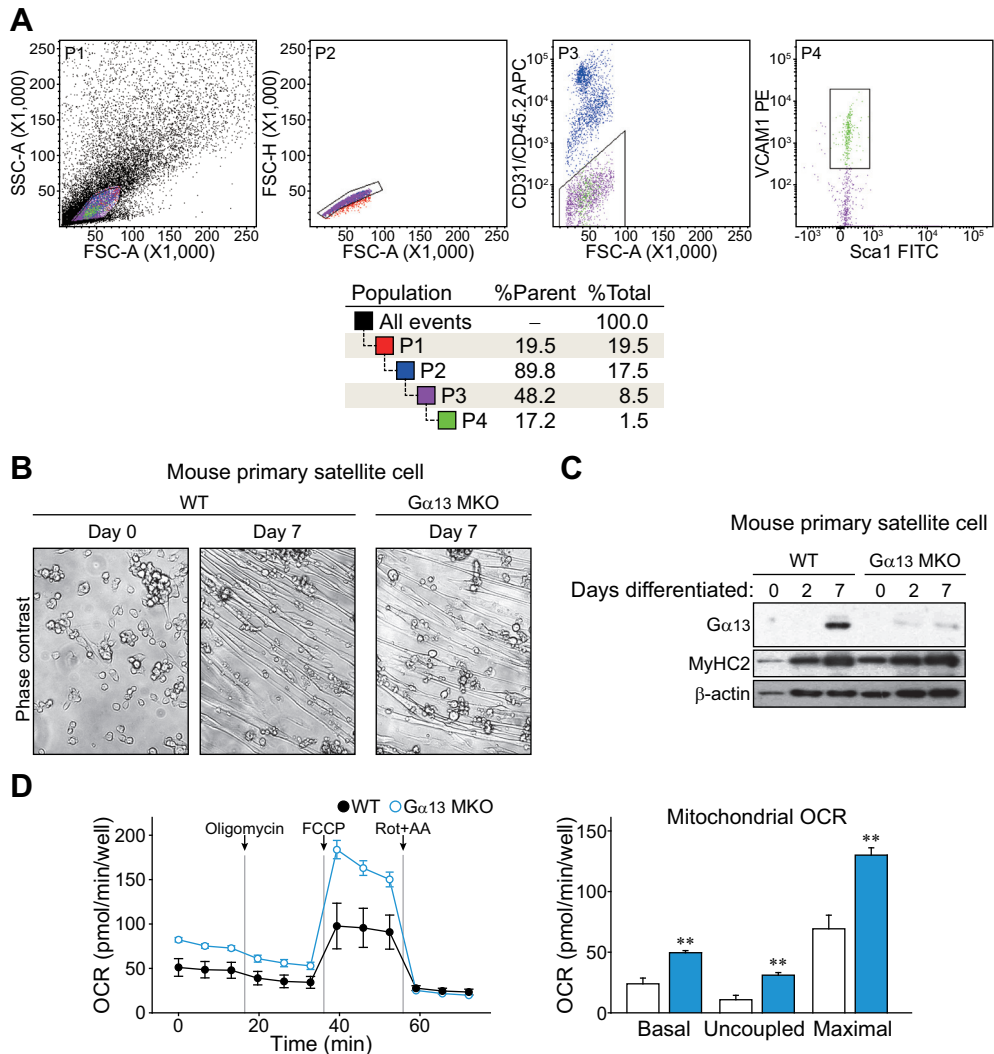


Figure 15. Loss of $G\alpha 13$ enhances cellular respiration

(A-C) Isolation and validation of primary satellite cells. (A) Representative plots for flow cytometry-based primary satellite cell isolation. Hindlimb muscles were stained with APC anti-CD31, APC anti-CD45.2, FITC anti-Sca1 and PE anti-VCAM1. Cells in the P4 gate were sorted as satellite cells. The population hierarchy is shown under. (B) Phase contrast images of isolated satellite cells. Cells from WT or $G\alpha 13$ MKO mice were differentiated to myotubes for indicated times.

(C) Immunoblotting for Gα13. Primary satellite cells from each genotype were differentiated as indicated. (D) Respiration assay. The oxygen consumption rate (OCR) of primary satellite cell-derived myotubes from each genotype. The OCR of basal, uncoupled (by addition of oligomycin), maximal (with FCCP, carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) and non-mitochondrial respiration (with rotenone plus antimycin A) were determined using an XFp Extracellular Flux Analyzer. Real-time triplicate readings (*Left*) and calculated mitochondrial respiration rates (*Right*) are shown (n=3 each). For D, The data are shown as the mean ±S.E.M. (significantly different as compared to WT, ** $P < .01$).

앞선 그림에서 보듯 심장에서의 $G\alpha 13$ 의 기저 발현은 골격근에 비해 매우 낮았다(**Figure 11A-C**). 본 연구에서 사용한 근육 선택적 $G\alpha 13$ 결손 마우스의 심장 근육조직에서도 부가적인 $G\alpha 13$ 의 감소가 관찰되었지만, 골격근에서의 감소에 비교하였을 때 그 정도가 미미하였다(**Figure 16A**). 유전자 결손 마우스는 체중 대비 심장 무게가 대조군과 차이가 없었고 조직학적인 소견상 심실 비대와 같은 심장의 변화 징후 역시 보이지 않았다(**Figure 16B,C**). 이와 유사하게 골격근에서 관찰되었던 미토콘드리아 신생성 유전자와 산화적 인산화 유전자의 발현 차이가 심장에서는 보이지 않았다(**Figure 16D**). 따라서 *Ckmm-Cre*를 이용한 근육 선택적 $G\alpha 13$ 의 결손이 심근의 기능이나 표현형에 미치는 영향은 크지 않은 것으로 보인다.

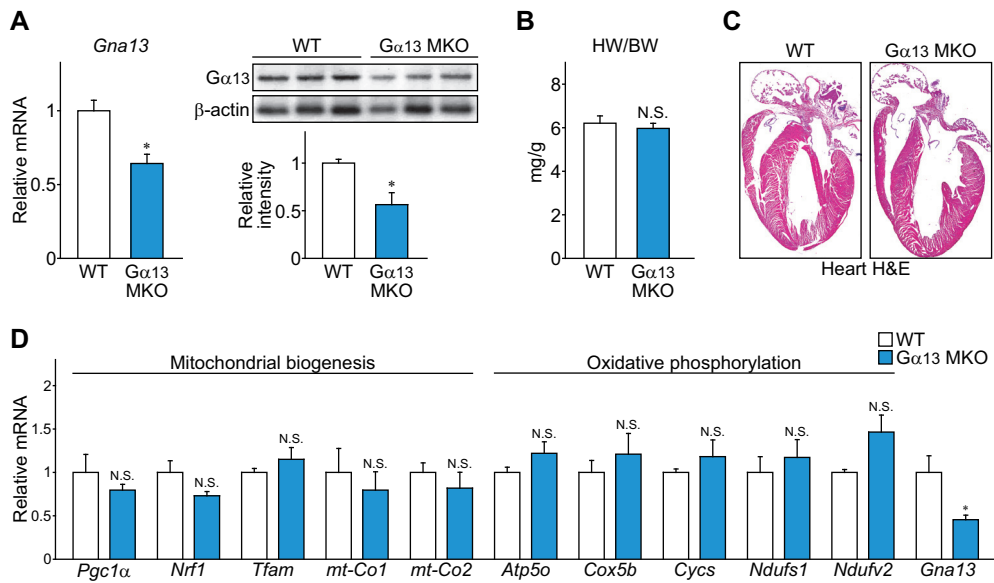


Figure 16. Analysis of gene expression and morphology of heart tissues from WT and *Gα13* MKO mice

(A) qPCR analyses of three samples each (*Left*) and immunoblottings (*Right*) for *Gα13* in WT and *Gα13* MKO heart tissue. (B) Heart-to-body weight ratio (n=3 each). (C) Representative H&E images of heart (n=3 each). (D) qRT-PCR assays (n=3 each). For all experiments, mice were fasted overnight prior to sacrifice. Data are shown as the mean \pm S.E.M. (* $P < .05$, N.S., not significant).

2-6. Ga13 에 의한 NFATc1 활성 변화 및 역할

NFATc1은 근섬유를 산화대사성 표현형으로 전환시키는 필요충분적 요소로 알려져 있다(Ehlers et al., 2014; Meissner et al., 2011). 따라서 NFATc1을 Ga13 결손에 의한 근섬유 표현형 전환에 일차 조절자로 우선 조명하였다. 세포 내 위치는 NFATc1의 활성을 결정하며 단백질의 인산화 상태에 따라 조절된다(Figure 17A). Ga13 결손 근육에서 핵 내 NFATc1의 양이 유의적으로 높아 기저상태에서 Ga13 이 NFATc1의 저해제로서 기능할 가능성을 시사하였다(Figure 17B). Ga13 결손 근육에서 전체 세포분획의 NFATc1 발현 또한 높았는데, 이는 NFAT 동형(isoform)단백질 중에서 NFATc1만이 가지는 자기유도효과에 의한 것으로 생각된다(Asagiri et al., 2005).

Ga13 의 NFATc1 억제효과를 더 직접적으로 확인하기 위해 3개의 NFAT 결합부위를 프로모터로 갖는 발광효소(luciferase) 발현 플라스미드를 활용한 실험에서 이와는 반대로 Ga13 의 Q229L 활성변이체(constitutively active mutant; Ga13QL)를 발현하는 아데노바이러스를 근육에 감염시키면 NFAT의 기저 활성뿐만 아니라 NFATc1을 과발현시킬 경우에도 활성이 억제되었다(Figure 17C). Ga13 은 NFATc1 핵내 이동을 억제하였으며, 특히 칼슘이온통로구(calcium ionophore)인 A23187 처리와 관계없이 억제현상을 보였다(Figure 17D). 나아가 NFAT의 전사적 활성 역시 칼슘의 양과 관계없이 Ga13 에 의해 억제되었다(Figure 17E). 이와 함께 기존에 NFATc1을 조절한다고 알려진 Calcineurin의 양과 효소활성이 Ga13 결손 근육에서 모두 변하지 않았다(Figure 17F,G). 따라서 Ga13 에 의한 NFATc1 활성 조절은 기존에 알려진 칼슘 의존적 신호경로와는 무관한 것으로 보인다. 부가적으로, 단백질분해효소복합체(proteasome) 억제제인 cycloheximide 처리 후에도 Ga13 에 의한 NFATc1의 억제가 관찰되었기 때문에 Ga13QL 이

NFATc1 단백질의 분해를 촉진해 핵 내부의 양까지 감소시킬 가능성은 배제하였다(**Figure 17H**).

NFATc1이 Gα13유도성 근섬유전환을 매개하는지를 알아보기 위해 전기천공법 기반 유전자 전달기법을 이용하여 NFATc1 shRNA를 골격근에 도입하였다. 전기천공 2주 후에 관찰한 결과 NFATc1의 감소는 Gα13 유전자 결손에 의한 근섬유 전환효과를 억제하였다(**Figure 17I**). 특히 CRISPR-매개 Gα13 유전자결손(Cong et al., 2013)을 통한 산소소모속도의 증가효과 역시 NFATc1의 결손에 의해 억제되었다(**Figure 17J**). 상기의 결과는 Gα13 매개 근섬유 전환이 NFATc1에 의존적임을 시사한다.

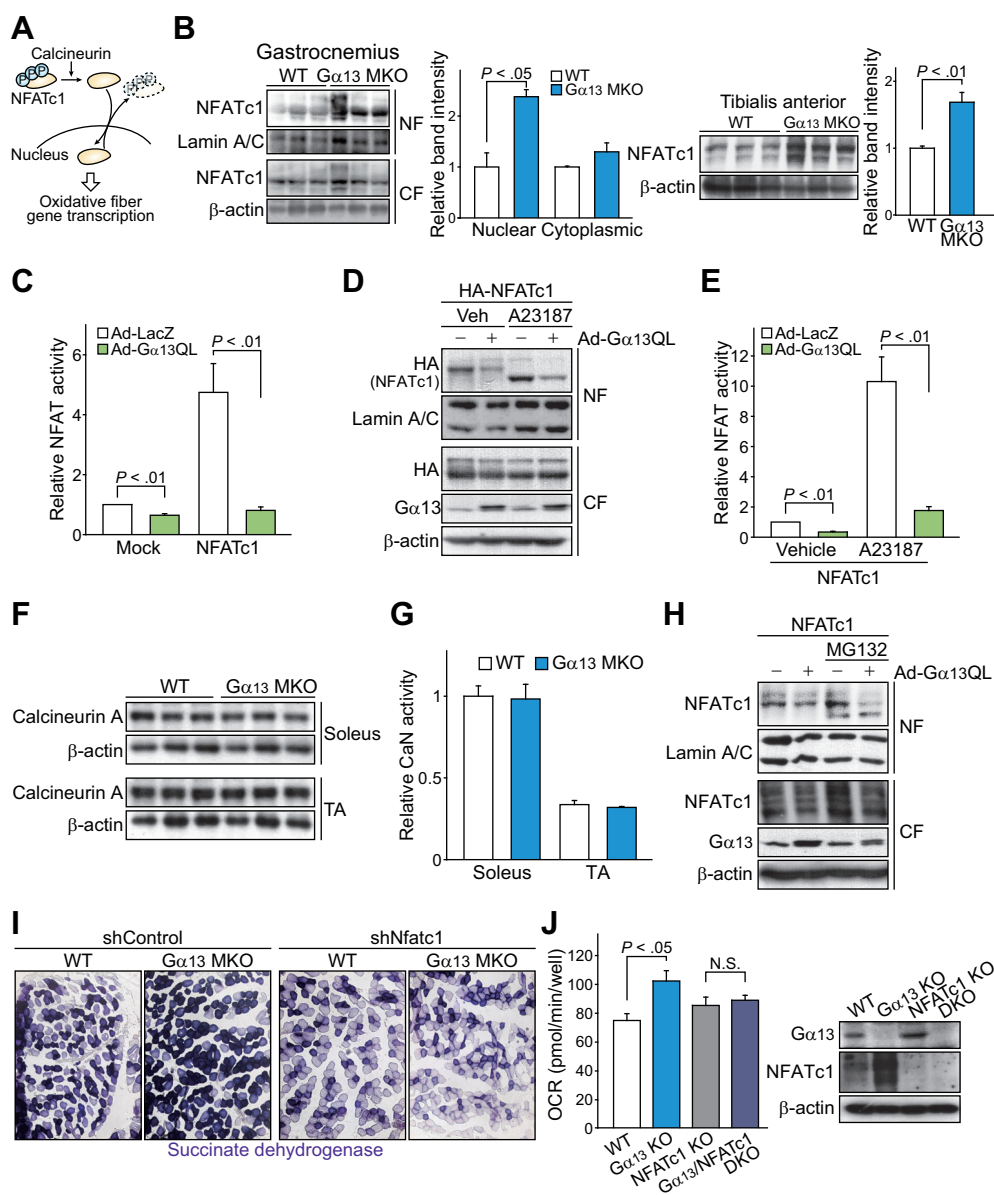


Figure 17. $G\alpha 13$ signaling inhibits NFATc1 to determine muscle fiber type, independently of calcineurin

(A) A schematic diagram of NFATc1 signaling pathway. Translocation is controlled by (de)phosphorylation on multiple sites. Nuclear NFATc1 mediates oxidative conversion of myofibers. (B) $G\alpha 13$ effect on intracellular localization and total

expression level of NFATc1 (n=3 each). *Left*, immunoblotting for NFATc1 in mouse gastrocnemius muscle. Mice were fasted overnight following sacrifice. NF, nuclear fraction; CF, cytoplasmic fraction. *Right*, immunoblotting for NFATc1 in the total lysate of mouse tibialis anterior muscle. **(C)** NFATc1 transcriptional activity assays (n=3 each). Luciferase reporter with 3x NFAT binding sequence upstream of a transcription start site was transfected to C2C12 myotubes with NFATc1 or control vector. Myotubes were then infected with adenovirus expressing indicated genes. Luciferase activity was assayed 48 h later. G α 13QL, constitutively active Q229L mutant of G α 13. **(D)** Immunoblotting for HA-tagged NFATc1. C2C12 myotubes were transfected with HA-tagged NFATC1 expression vector, followed by adenoviral infection of LacZ or G α 13QL. A23187 or vehicle was added 12 h prior to the assay. **(E)** NFATc1 transcriptional activity assays (n=3 each). Luciferase activity was assayed in C2C12 myotubes treated as in D. **(F)** Immunoblottings for calcineurin A in the indicated skeletal muscles of mice fasted overnight. **(G)** Calcineurin activities. Calcineurin phosphatase activity was measured using RII substrate peptide on the same muscles as in F. The relative activity represents the difference between total phosphatase activity and that in the presence of EGTA, as normalized by protein content in lysates. **(H)** Immunoblottings for NFATc1. After adenoviral infection, C2C12 myotubes treated with MG132 for 12 h. **(I)** Representative histochemical staining of SDH activity in TA muscles (n=3-4 per genotype). Muscles were snap-frozen 14 days after electroporation-mediated delivery of plasmid encoding shRNA. Each mouse received a control plasmid in one limb (shControl), and the plasmid encoding shNFATc1 in the contralateral limb. **(J)** Respiration assay. Basal oxygen consumption rates were determined using an XFp Extracellular Flux Analyzer. C2C12 myotubes of indicated genotypes were prepared

by CRISPR-mediated gene editing (n=3 each). All data are shown as the mean \pm S.E.M. (N.S., not significant).

2-7. Rock2에 의한 NFATc1의 활성화 조절 및 기전

Gα13 신호전달체계의 주요 인자인 RhoA의 Q63L 활성변이체 역시 Gα13QL과 유사한 NFATc1 활성화 억제효과를 보였다(**Figure 18A**). Rock1과 Rock2는 RhoA 신호를 매개하는 인산화효소이다(Julian and Olson, 2014). 인간과 설치류의 골격근은 Rock2가 주로 발현되고 Rock1은 상대적으로 적게 발현된다고 알려져 있다. 본 연구에서도 RNA-seq 데이터와 마이크로어레이 데이터로부터 인간 골격근에서 Rock2 특이적 발현을 확인하였다(**Figure 18B**). 예상대로 Rock2의 발현을 억제하면 Gα13의 NFATc1 억제효과가 해제되었으며, Rock1의 발현 억제는 효과를 보이지 않았다(**Figure 18C**). 이러한 결과는 골격근에서 Gα13 신호 하위에 Rock2가 작용하여 NFATc1을 조절함을 시사하였다.

Rock2 매개 NFATc1 조절기전을 상세히 탐구하기 위해 인간 재조합 단백질을 이용한 시험관내 GST pull-down 분석을 수행하여 활성화 Rock2와 NFATc1 단백질간의 물리적 결합을 발견하였다(**Figure 18D**). 이는 세포기반 면역침강법으로도 확인하였는데, 이들 단백질의 결합은 Rock2 억제제인 Y-27632에 의해 해제되었기 때문에 Rock2의 효소활성이 NFATc1과의 결합에 중요하다고 예측하였다(**Figure 18E**). 이후 체계적인 NFATc1 변이체 연구를 통해 Rock2가 NFATc1의 NFAT 유사영역(NFAT homology region; NHR)과 C말단영역(C-terminal domain; CTD) 두 부위에 결합함을 발견하였다(**Figure 18F**).

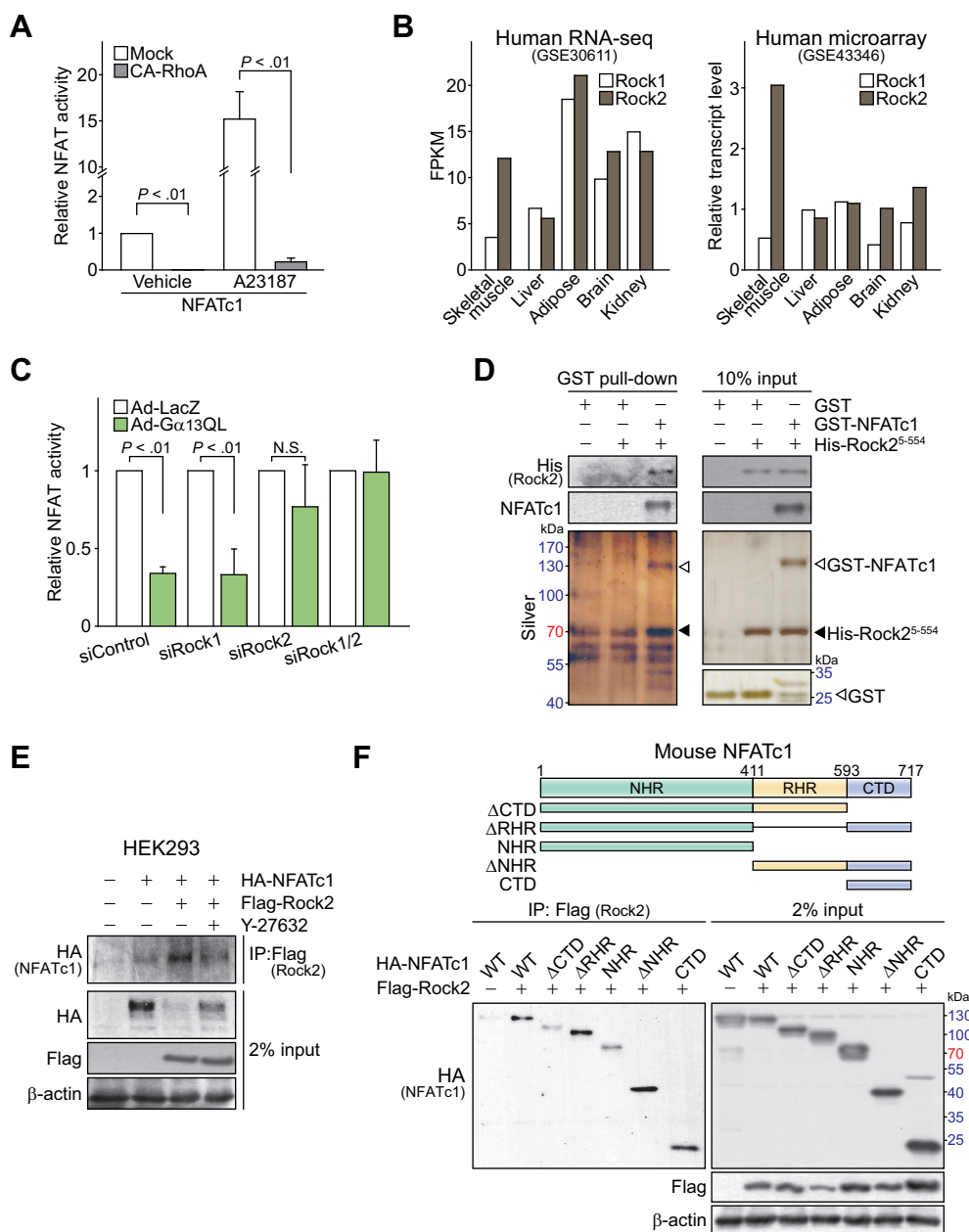


Figure 18. Rock2 associates with NFATc1 and inhibits the activity

(A) NFATc1 transcriptional activity assays (n=3 each). Using C2C12 myotubes, plasmids encoding for NFAT activity luciferase and N FATc1 were co-transfected

with CA-RhoA or control vector. Luciferase activity was assayed 48 h after transfection. **(B)** Tissue distribution of Rho kinase (Rock) isoforms in an RNA-seq (*Left*) or a microarray (*Right*) data using human samples. The data were extracted from GSE30611 or GSE43346. **(C)** NFATc1 transcriptional activity assays (n=3 each). NFATc1 activity reporter plasmid was transfected to C2C12 myotubes with siRNAs against Rock1 and Rock2 or control siRNA as indicated. After 36 h, the cells were infected with adenovirus encoding LacZ or G α 13QL. Luciferase activity was assayed after another 36 h. **(D)** GST pull-down assay. Recombinant GST or GST-NFATc1 fusion proteins were immobilized on glutathione-agarose beads and incubated with His-tagged recombinant human ROCK2 fragment (5-554 residue). The *in vitro* interaction of NFATc1 and ROCK2 was assessed by either silver staining or immunoblotting with His-tag-specific antibody. **(E)** Immunoprecipitation (IP) assays. HEK293 cells were transfected with HA-tagged NFATc1 and/or Flag-tagged Rock2 as indicated. Y-27632 (3 μ M) was added 12 h prior to the assay. **(F)** Top, schematic representation of N-terminal HA-tagged full-length NFATc1 (WT), along with its deletion mutants. NHR, NFAT homology region; RHR, REL-homology region; CTD, C-terminal domain Bottom, immunoprecipitation assays. HEK293 cells were transfected with indicated NFATc1 constructs along with Flag-tagged Rock2 for 24 h, and the lysates were subjected to pulldown assay. For **A-C**, data are shown as the mean \pm S.E.M. (N.S., not significant).

NFATc1에 대한 Rock2의 인산화능을 시험관내 인산화효소활성측정법을 통해 분석하였다(**Figure 19A**). 예상대로 Rock2가 직접 NFATc1을 인산화하였으며 이는 반응용액에 Y-27632를 첨가하였을 때 억제되었다. 이 때 Rock2의 자기인산화 역시 억제되었다. Rock2에 의한 인산화 부위를 규명하기 위해 시험관 내 인산화 직후 이중질량분석(LC/MS/MS)을 수행한 결과 Rock2가 인간 NFATc1의 Ser241과 Ser345 잔기(마우스에서는 Ser243, Ser347 잔기에 해당)를 인산화하는 것을 발견하였다(**Figure 19B**). Ser241 잔기는 특히 주변의 아미노산 서열이 이종간 진화적 보존이 잘 되어있지만 Ser345 잔기는 그렇지 않았다(**Figure 19C**). 인산화의 위치특이성을 확인하기 위해 Ser243과 Ser347 잔기가 알라닌으로 변이된 NFATc1을 C2C12세포에 발현시켰다. 이를 위해 NFATc1 특유의 자기유도현상으로부터 발생할 오류를 배제하기 위해 NFATc1 결손 세포를 사용하였다. Ser243 잔기를 알라닌으로 변이하면 Gα13에 의한 억제효과가 사라졌으며, Ser347 잔기는 그러한 효과를 보이지 않았다(**Figure 19D**). 나아가, Ser243 잔기 주위 8개의 아미노산으로 이루어진 경쟁적 올리고펩타이드를 반응용액에 첨가하면 Rock2의 자기인산화는 일어남에도 불구하고 NFATc1의 인산화만 특이적으로 억제되었다(**Figure 19E**).

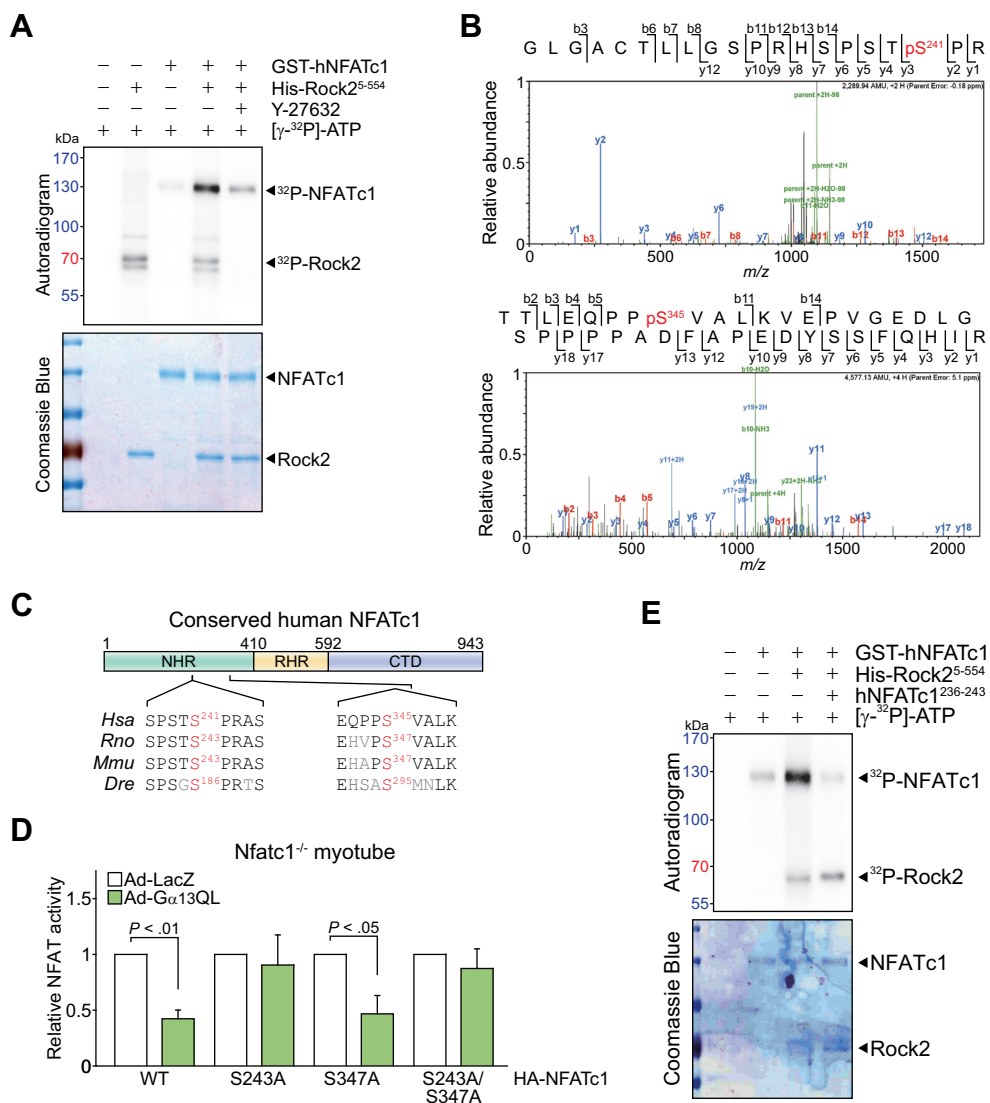


Figure 19. Rock2 phosphorylates NFATc1 at Ser243

(A) In vitro kinase assay. Recombinant proteins and ³²P-ATP were incubated with or without Y-27632 (10 μ M), and phosphorylation was visualized by autoradiography. (B) LC/MS/MS analysis of human NFATc1 after incubation with human ROCK2⁵⁻⁵⁵⁴. (C) Schematic illustration of NFATc1 protein domains and a sequence comparison of positive hits among different species. (D) NFATc1 transcription

activity assay. NFATc1 knockout C2C12 myotubes were transfected with NFATc1 reporter plasmid and wild-type (WT) NFATc1 or its serine-to-alanine mutant (n=3 each). Data are shown as the mean \pm S.E.M. (E) *In vitro* kinase assay. An 8-mer peptide surrounding Ser241 residue was added to the reaction.

NFATc1의 Ser243 잔기 인산화를 개체 수준에서 검증하고자 해당 부위의 인산화를 특이적으로 검출할 수 있는 항체를 제작하였다(**Figure 20A**). NFATc1 결손 C2C12 근관에서 Ser243 변이 NFATc1의 신호가 억제되는 것을 통해 제작한 항체의 잔기 특이성을 검증하였고, 동일한 항체로 *in vivo* 모델에서 Ser243 인산화의 기능적 중요성을 평가하였다. Gα13의 결손은 앞정강근에서 Ser243이 인산화된 NFATc1의 양을 유의적으로 억제하였다(**Figure 20B**). 운동을 후의 근육에서는 Gα13의 감소 양상과 유사하게 NFATc1의 Ser243 인산화가 억제되었다(**Figure 20C**). 반면 NFATc1의 Ser243 잔기는 정상인에 비해 2형 당뇨병 환자의 근육에서 인산화가 많이 발생하였다(**Figure 20D**). 이와 유사하게 NFATc1의 Ser243 인산화는 고지방식이를 섭취한 비만 마우스의 근육에서도 증가하는 양상을 보였다(**Figure 20E**). Rock2가 Gα13 하위 신호로서 Ser243 잔기에 NFATc1을 인산화시키고 이 현상이 운동에 의해 감소하거나 대사질환 상황에서 증가되어 있다는 상기의 연구 결과는 새롭게 발견한 NFATc1의 인산화효소로서 Rock2의 병태생리적 중요성을 시사한다.

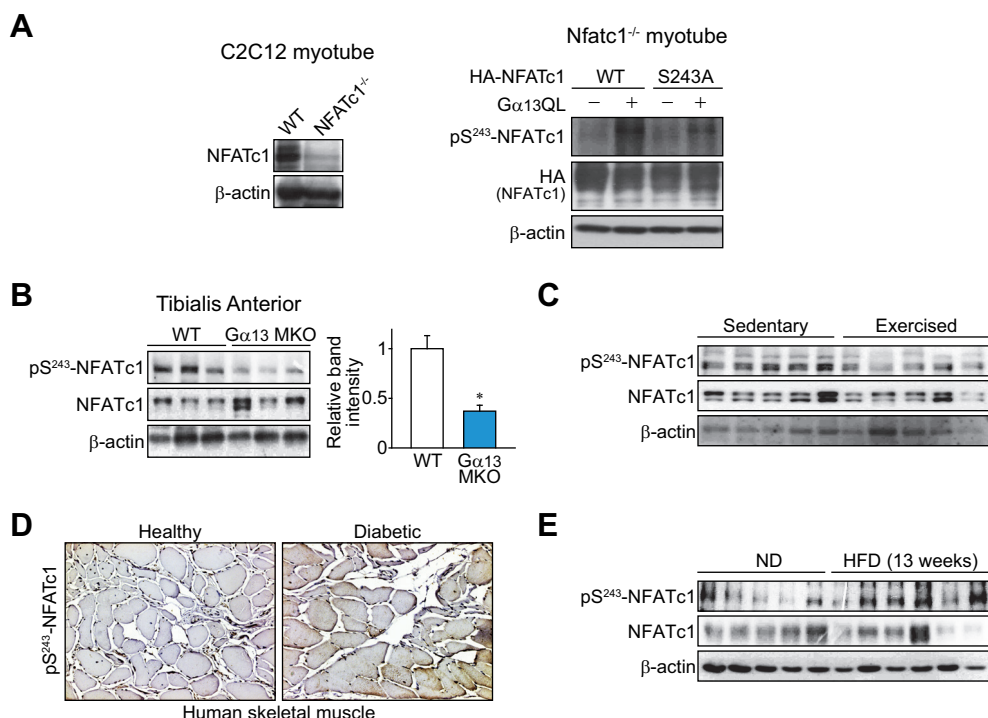


Figure 20. Ser243 phosphorylation of NFATc1 parallels Gα13 level *in vivo*

(A-C) Immunoblottings for phosphoserine243-NFATc1. (A) NFATc1-knockout C2C12 myotubes were transfected with a plasmid encoding WT NFATc1 or its S243A mutant with or without CA-Rock2 plasmid. Adenoviral infection of Gα13QL was done 12 h after the transfection. Samples were prepared after another 24 h. (B) Mice of each genotype were fasted overnight before sacrifice (n=3 each). (C) Mice were subjected to 1 h of exercise and rested for 4 h before sacrifice. (D) Immunohistochemistry for phosphoserine243-NFATc1 in the human specimens same as in Figure 1E. (E) Immunoblottings. Mice were fed on a normal (ND) or high-fat diet (HFD) for 13 weeks. Mice were fasted overnight before sacrifice. For B, data are shown as the mean ±S.E.M. (**P* < .05).

2-8. 고지방식이 유도성 비만에 미치는 근육 $G\alpha 13$ 의 영향

일반적으로 근섬유 구성과 산화대사능을 조절하는 요소는 전신의 지방 대사에도 영향을 미친다(Lin et al., 2005a; Rangwala et al., 2010). 따라서 $G\alpha 13$ 의 결손이 체중 조절에 미치는 영향을 측정하고자 각 유전형의 마우스에게 고지방식을 투여하였다. 첫 주째부터 $G\alpha 13$ MKO 마우스가 체중 증가에 저항성을 보여 실험 종료시점까지 야생형보다 10% 적은 체중을 유지하였다(Figure 21A). 기저상태에서도 $G\alpha 13$ MKO 마우스가 같은 몸무게의 야생형에 비해 지방을 적게 가지고 있었으나 이러한 차이는 고지방식이 후에 더욱 심화되어 지방조직의 양적 차이가 두 유전형간 체중 차이의 대부분에 기여하였다(Figure 21B). CLAMS 기기를 통해 식이 섭취와 전신 에너지 소모를 측정하여 에너지 균형을 분석하였다(Figure 21C). $G\alpha 13$ MKO 마우스는 야생형과 같은 양의 식이를 섭취하고 비슷한 운동량을 보였으나 상대적으로 높은 에너지 소모율을 기록하였고, 산소소모량도 더 높았다. 이와 유사하게, Oil Red O 염색을 통한 조직학적 관찰 결과 근세포 내 지방 축적이 $G\alpha 13$ MKO 마우스에서 억제되었다(Figure 21D). 또한 동일한 결과를 근세포 내 중성지방 질량분석을 통해 확인하였다(Figure 21E). $G\alpha 13$ MKO 마우스의 골격근이 지방흡수속도가 더 높았으나 지방 분해를 촉진하는 유전자들의 발현은 공통적으로 높았다(Figure 21F,G). 이러한 결과 종합할 때 $G\alpha 13$ 결손은 골격근이 혈류로부터 보다 더 효율적으로 지방을 제거하고 분해함으로써 에너지 소모를 촉진하는 것으로 보인다.

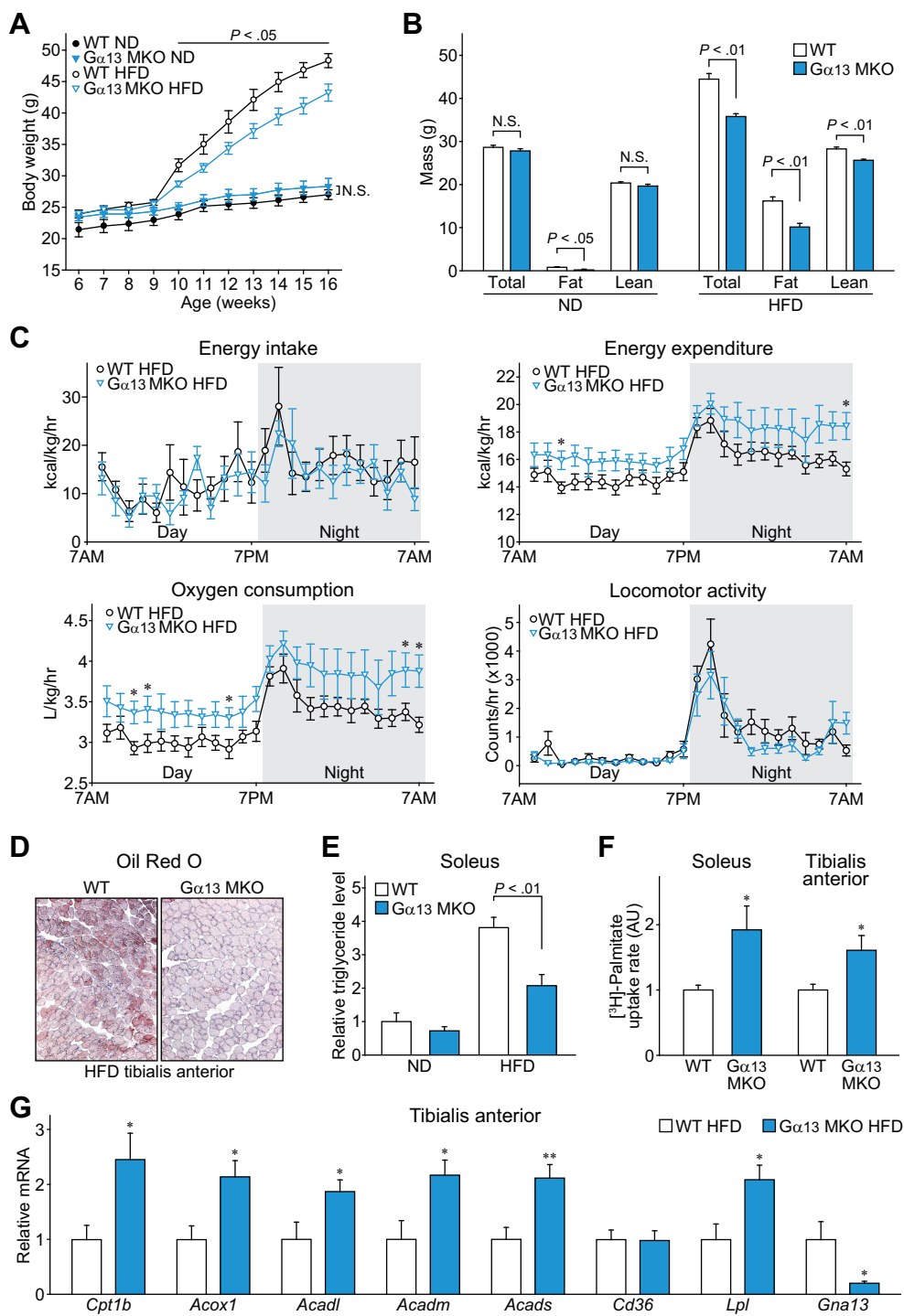


Figure 21. $G\alpha 13$ MKO mice are protected from diet-induced adiposity with increased fatty acid metabolism

(A) Body weight gain. Nine-week-old WT or $G\alpha 13$ MKO mice were fed on a normal (ND) or high-fat diet (HFD) for 9 weeks (n=6-8 each). (B) Determination of fat and lean mass in HFD-fed WT and $G\alpha 13$ MKO mice using nuclear magnetic resonance (n=8 each). (C) *In vivo* energy balance were analyzed using individual metabolic cages (n=8 each). (D) Oil red O staining of TA muscle after HFD feeding. (E) Muscle triglyceride content. Relative amount of triglyceride normalized with protein concentration was assessed in mouse soleus muscles (n=6-8 each). (F) *Ex vivo* fatty acid uptake assay (n=3 each). (G) qRT-PCR assays for transcripts of the genes associated with lipid uptake and oxidation (n=6-8 each). All data are shown as the mean \pm S.E.M. (significantly different as compared to WT, * $P < .05$; ** $P < 0.01$).

조직학적 관찰결과 근육이나 지방조직은 유전자 결손에 따른 특징적인 소견을 보이지 않았다(**Figure 22A,B**). 그러나 흥미롭게도 *Gα13* MKO 마우스는 9주간의 고지방식이 섭취 후에도 지방간이 발달하지 않는 현상을 보였다(**Figure 22C**). 특히 고지방식이 섭취에 의해 발생하는 체중대비 간 무게비율의 증가현상이 일반 식이를 섭취한 마우스와 비슷한 수준으로 억제되었다. 상기의 결과는 *Gα13* 결손의 유익한 효과가 근육조직의 지방 분해를 증가시키는 것에 한정된 것이 아니라 전신 지질 축적을 감소시키는 것까지도 포함함을 시사한다.

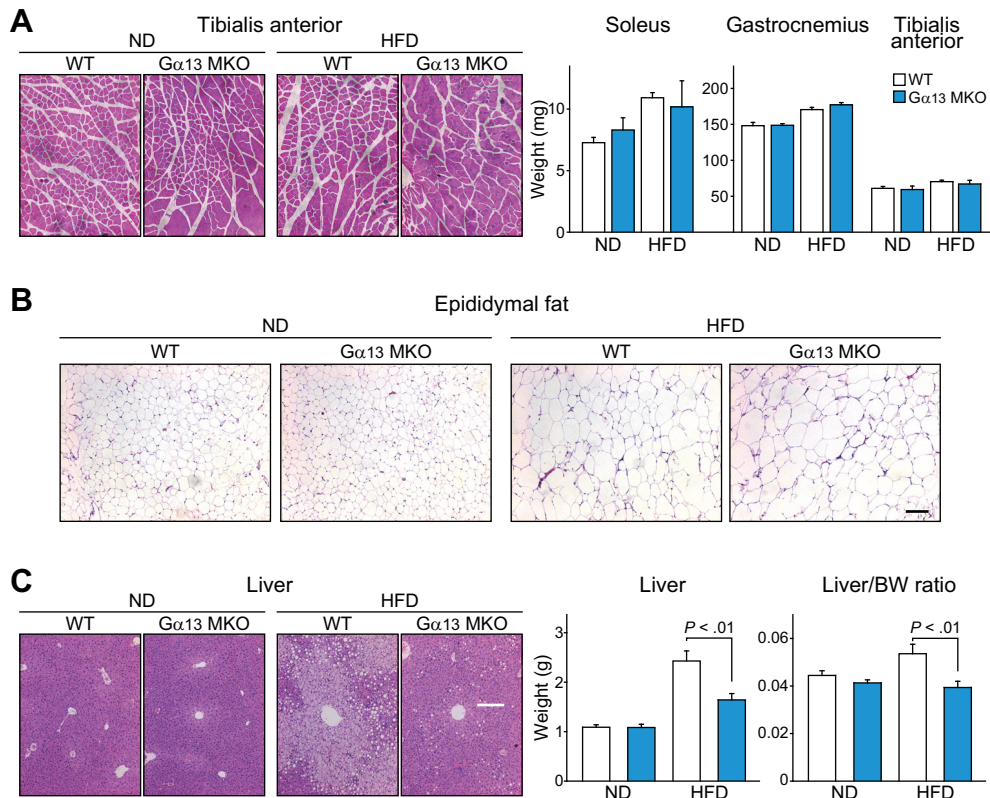


Figure 22. Skeletal muscle $G\alpha 13$ deletion inhibits development of diet-induced steatosis in the liver

(A-C) Hematoxylin and Eosin staining and weights of skeletal muscles (A), Adipose tissues in the epididymal depot (B), and livers (C) (n=6-8 each). Mice were fasted overnight prior to the assays. All data are shown as the mean \pm S.E.M.

2-9. 식이유도성 당뇨와 인슐린 저항성에 대한 근육 $G\alpha 13$ 의 영향

근세포 내 지질은 임상적으로 인슐린 저항성을 일으키는 일차적 요소로 알려져 있다(Jacob et al., 1999; Krssak et al., 1999; Perseghin et al., 1999). 골격근에서 미토콘드리아 기능 손상과 산화대사능의 감소는 인슐린 저항성과 밀접한 관련이 있다(Simoneau and Kelley, 1997). $G\alpha 13$ 의 골격근 선택적 결손은 고지방식이 섭취 모델에서 공복시에 고혈당과 고인슐린혈증을 억제하였다(Figure 23A). 이는 이자섬(pancreatic islet)의 적응적 크기 변화로도 비슷한 경향을 관찰할 수 있었다(Figure 23B). 탈체(*ex vivo*)분석법을 통해 $G\alpha 13$ 이 결손된 근육이 식이에 의해 유도되는 인슐린자극성 포도당흡수 억제현상에 저항성을 보였다(Figure 23C). 나아가 $G\alpha 13$ MKO 동물은 대조군에 비해 식이유도성 전신 당내성(glucose tolerance)과 인슐린내성(insulin tolerance) 저하현상이 억제되어 인슐린 감수성이 높았다(Figure 23D,E).

단백질 수준에서 분석 결과 $G\alpha 13$ MKO 마우스 골격근에서 인슐린 저항성 지표인 Ser307-IRS1와 JNK의 인산화가 감소하였으며, 인슐린 감수성 지표인 Akt와 GSK3 β 인산화는 증가하였다(Figure 23F). 같은 경향으로 급성 인슐린 자극에 의해 증가하는 Thr308- 및 Ser473-Akt, S6의 인산화가 $G\alpha 13$ MKO 골격근에서 더욱 민감하게 증가하였다(Figure 23G).

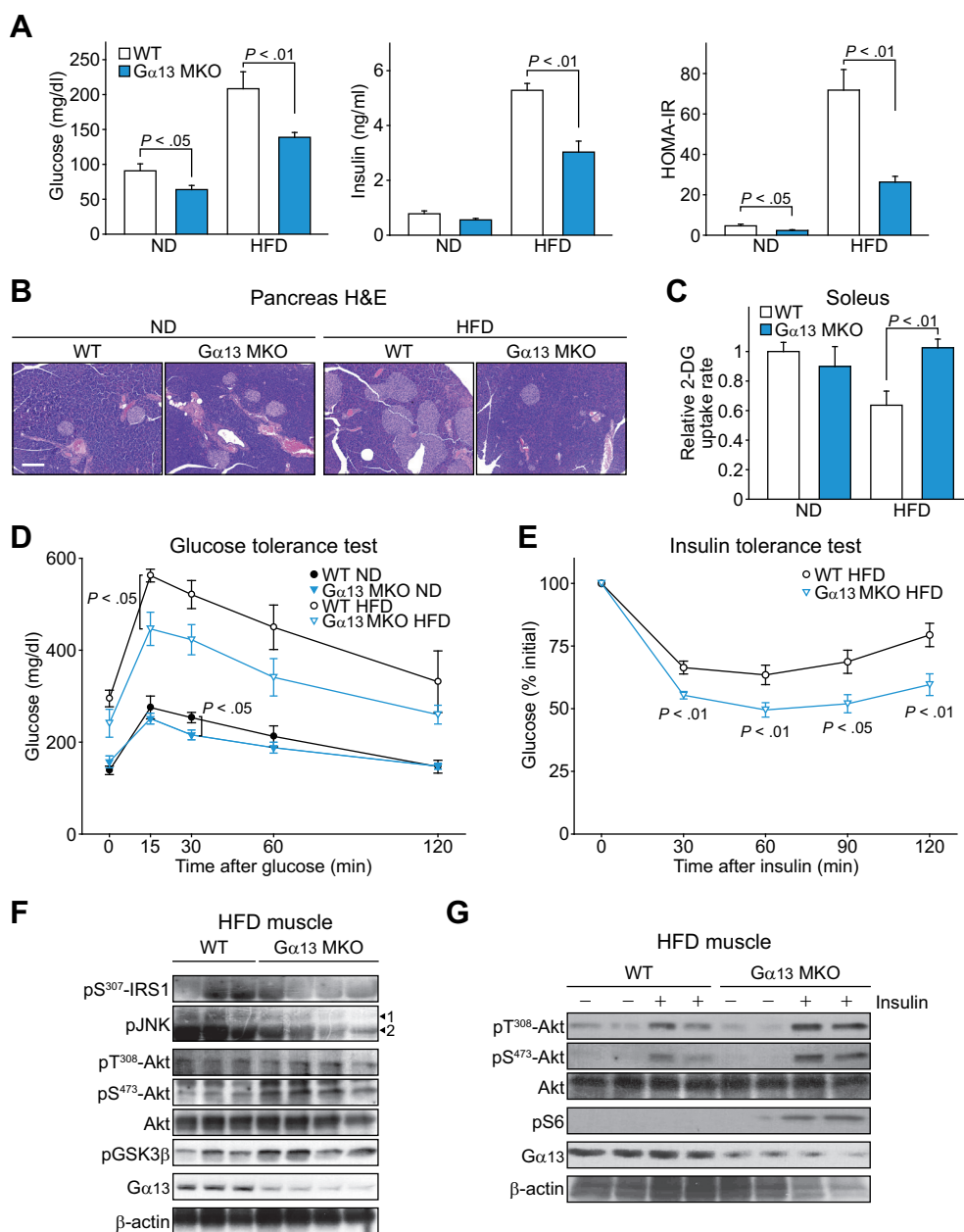


Figure 23. Ga13 MKO mice are protected from diet-induced insulin resistance
(A) Fasting serum glucose and insulin levels. HOMA-IR was calculated from both parameters. Wild-type (WT) or Ga13 MKO mice were fed on a normal (ND) or

high-fat diet (HFD) for 9 weeks. Mice were fasted overnight prior to assays (n=6-8 each). **(B)** Representative hematoxylin and eosin staining of pancreatic islets (n=6-8 each). **(C)** Maximal 2-deoxy glucose (2-DG) uptake assay using isolated soleus muscles. Mice were fasted overnight before sacrifice (n=6 each). **(D)** Glucose tolerance test and **(E)** insulin tolerance test. Mice fed on a high-fat diet or a normal diet for 9 weeks were subjected to blood glucose measurement (n=6-8 each). **(F)** Immunoblottings for the markers of insulin resistance. Soleus muscles were from HFD-fed mice fasted overnight. **(G)** Immunoblots after acute insulin injection. Mice of each genotype fed on a HFD were sacrificed 15 min after insulin injection. All data above are shown as the mean \pm S.E.M.

인슐린 감수성을 더 정확하게 평가하기 위해 각 마우스에 대해 고인슐린혈증 정상혈당 클램프(hyperinsulinemic-euglycemic clamp)분석을 수행하였다. $G\alpha 13$ MKO 마우스는 대조군에 비해 4.8배가량 높은 포도당 주입 속도(glucose infusion rate)를 요구하여 유의적으로 높은 전신 인슐린 감수성을 보였다(**Figure 24A**). 이 차이는 인슐린 감수성을 대표하는 전신 포도당 흡수의 촉진과 간의 포도당 신생성의 억제에서 비롯되었다(**Figure 24B,C**). 클램프 실험 중 분석된 근육의 조직 특이적 포도당 흡수속도가 $G\alpha 13$ MKO 마우스에서 유의적으로 높았다(**Figure 24D**). 흥미롭게도, 발견된 근육 $G\alpha 13$ 결손에 의한 지방간 억제 현상과 본 실험에서 관찰한 간 인슐린 감수성의 개선이 일치하는 경향을 보였다.

상기의 결과를 종합해볼 때 $G\alpha 13$ 의 결손은 Rock2의 억제를 매개하여 NFATc1을 활성화시키고, 이를 통해 근섬유의 산화대사능을 증가시켜 전신 에너지 대사를 촉진하는 운동유사효과를 나타낸다(**Figure 24E**).

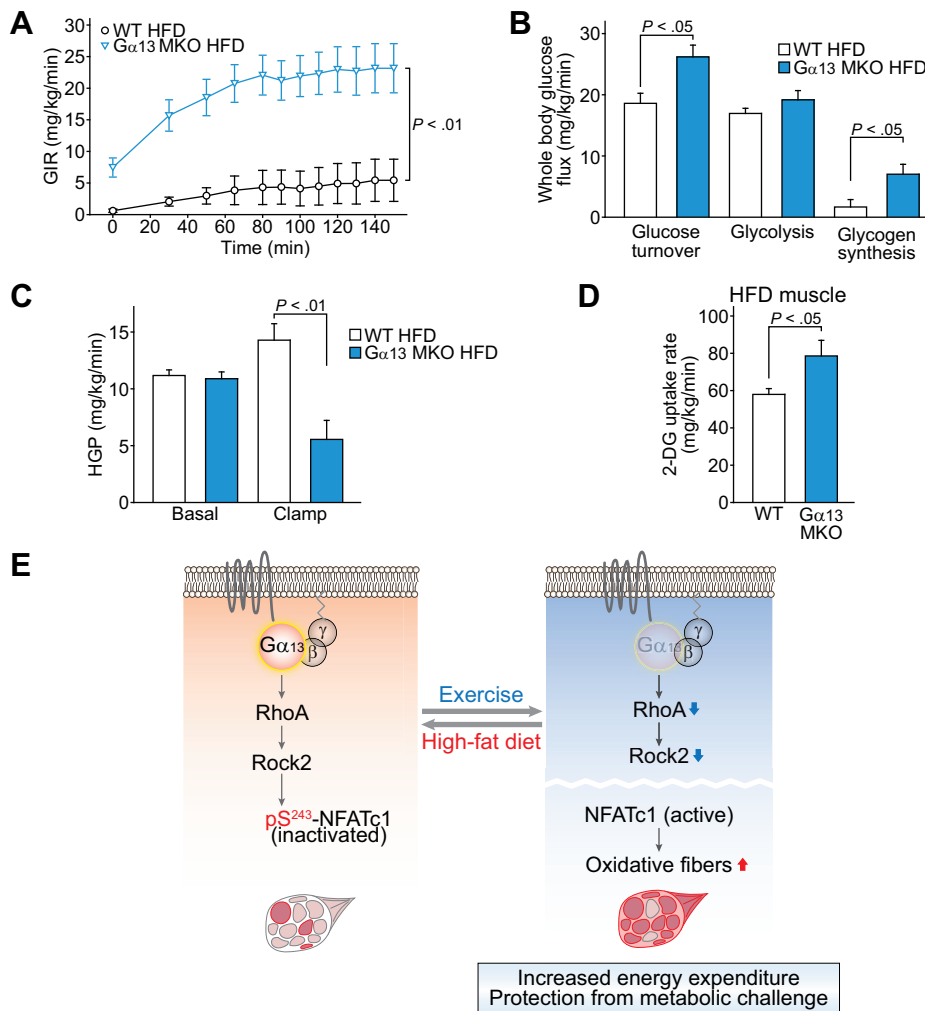


Figure 24. $G\alpha 13$ ablation improves whole-body insulin sensitivity

(A-D) Whole body and tissue-specific insulin sensitivities were assessed in HFD-fed mice using hyperinsulinemic-euglycemic clamp ($n=6-7$ each). (A) Glucose infusion rate. (B) Whole body glucose uptake, glycolysis, and glycogen synthesis rates. (C) Hepatic glucose production rate (HGP). (D) 2-Deoxy glucose uptake rate in gastrocnemius muscles during clamp. (E) A schematic diagram by which $G\alpha 13$ and downstream signaling molecules control muscle fiber type and metabolic homeostasis. All data above are shown as the mean \pm S.E.M.

IV. 고 찰

지속적이고 과도한 소포체 스트레스는 세포사멸, 염증, 지방 축적 등의 병리현상을 일으킨다(Xu et al., 2005). 이 때 비접힘반응이 유도하는 결과는 세포의 종류에 따라 달라지는데, 뉴런의 수초형성, 지방세포의 아디포카인 분비, 거품세포의 형성, β 세포의 인슐린 분비 등과 같이 세포 및 기관 특이적으로 나타난다(Feng et al., 2003; Lin et al., 2005b; Marwarha et al., 2012; Zhang et al., 2009). 활성화형으로 전환분화된 정상세포와 근세포는 단백질 합성과 분비가 활발하여 소포체의 기능 요구량이 높은 세포유형이다. 따라서 본 연구에서는 이들 세포를 중심으로 소포체 스트레스의 대사질환 조절 기전을 탐구하였다.

1-1. 새로운 간 정상세포 활성화 기전 규명

간섬유화(liver fibrosis)는 간염 바이러스, 약물에 의한 간염, 알코올성 및 비알코올성 지방간염 등을 포함한 다양한 간 손상이 지속적으로 가해짐에 따라 간에 수축성 섬유가 과도하게 축적되는 질환이다(Friedman, 2008). 특히 지방간이나 고지질혈증 등 대사 증후군에 의해 발병 위험성이 증가하기 때문에 간섬유화는 대표적인 대사질환으로 여겨지는데, 섬유화 단계에서 수축성 섬유가 더욱 축적되면 조직이 경화되는 간경변으로 악성화되고 이후 간암으로 발전하여 주요한 사망원인으로 작용한다(Pellicoro et al., 2014). 하지만 아직까지 간섬유화를 치료할 수 있는 약물은 개발된 바가 없기 때문에 복잡한 병리기전을 분자적으로 이해하고 새로운 치료 표적을 발굴하는 노력이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 대사질환의 대표적 2차 질환인 간섬유화의 발병기전을 탐구하고 특히 이 질병의 핵심적인 세포인 간정상세포의 유형 전환을 억제할 수 있는 치료 표적을 발굴하고자 하였다.

본 연구에서 인체 시료를 이용하여 간섬유화의 진행에 따라 소포체 스트레스가 축적되는 현상을 발견하였고 이에 착안하여 정상세포에 가해지는 소포체 스트레스가 간섬유화의 원인으로 작용함을 세포선택적 Grp78 유전자 전달 실험을 통해 생체 내에서 증명하였다. 이에 대한 기전연구로 소포체 스트레스가 SMAD2의 발현량을 증가시킴에 주목하였고, 이 현상이 hnRNPA1의 불안정화로 인해 miR-18a가 감소하는 것에 기인함을 발견하였다. 나아가 PERK에 의한 hnRNPA1의 Thr51 아미노산 잔기 인산화가 불안정화를 촉진함을 밝히고 hnRNPA1을 정상세포에 과발현하면 간섬유화가 억제됨을 동물실험을 통해 규명함으로써 소포체 스트레스와 간섬유화 간의 연결고리를 제시하였다.

1-2. TGFβ 신호전달체계에 관한 본 연구의 의의

TGFβ 수용체 활성화에 의한 하위 신호전달은 대부분 SMAD2/3를 매개로 한다(Massagué, 2012). TGFβ 리간드가 수용체에 결합하면 수용체는 SMAD2와 SMAD3 단백질을 인산화시키고 이를 통해 활성화된 이들 단백질은 SMAD4와 결합하여 핵 안에서 각종 유전자의 전사활성을 조절한다. TGFβ 신호는 특히 간 정상세포의 유형을 전환시키는 가장 강력한 자극으로 알려져 있는데, SMAD2/3 단백질은 콜라겐 유전자의 발현을 촉진하고 세포골격 단백질을 재구성하는 각종 유전자를 발현시키며 간염과 간섬유화를 촉진하는 각종 사이토카인의 분비를 증가시키는 등 다양한 경로를 통해 정상세포를 활성화시키는 작용을 한다(Gressner et al., 2002). 실제로 혈액 내의 TGFβ를 억제하면 간을 포함한 전신의 다양한 장기에서 공통적으로 항섬유효과를 보인다는 것이 연구된 바 있다(Rosenbloom et al., 2010). 따라서 간 섬유화 치료에 있어 TGFβ 신호전달체계의 감수성을 조절할 수 있는 세부적인 기전에 대한 이해가 필요하다.

정상세포에서 TGF β 및 하위 신호전달의 중추적인 역할에도 불구하고, SMAD2의 발현량 증가현상은 기존에 보고된 바가 없다. 본 연구에서 중증 섬유화 환자의 간에서 소포체 스트레스 증가와 함께 SMAD2 특이적인 증가현상을 발견하였고, SMAD2의 양이 섬유화나 소포체 스트레스의 정도와 양의 상관관계에 있음을 밝혔다. 또한 정상세포에서 SMAD2 발현 증가가 소포체 스트레스로 인한 섬유화 유전자 발현을 매개함을 세포 모델에서 검증하였다. 특히 SMAD2의 양적 증가는 TGF β 수용체로부터 표적 유전자의 전사활성화로 이어지는 신호전달체계를 세포표면의 리간드-수용체 반응과는 독립적으로 증폭시킬 것으로 사료되기 때문에 소포체 스트레스와 TGF β 신호전달체계 연구에 새로운 관점을 제공하였다.

2-1. 새로운 근세포 유형 전환 기전 규명

비만과 인슐린저항성은 대사성질환의 중추적인 원인이다(Jou et al., 2008). 식이 섭취로 인한 탄수화물과 지방 등의 에너지원 유입은 혈중 인슐린 신호를 통해 근육에서 에너지 소모를 촉진하도록 한다(Efeyan et al., 2015; Samuel and Shulman, 2016). 근육은 대사성 당뇨의 초기단계에서 가장 먼저 기능이 저하되는데(DeFronzo and Tripathy, 2009), 근육의 인슐린 저항성은 간과 지방 등 다른 조직에서의 인슐린저항성도 같이 수반하여 전신적 대사질환을 유발하기 때문에 에너지대사 질환의 발병 및 심화기전을 이해하기 위해 근육생리를 이해하는 것이 필수적이다(Kim et al., 2001).

포유류의 근섬유는 특징적으로 발현하는 마이오신 H사슬(myosin heavy chain)의 종류에 따라 1, 2a, 2x, 2b형으로 세분화된다(Schiaffino and Reggiani, 2011). 대사적 특징에 따른 분류상 1형과 2a형은 미토콘드리아 함량이 높고 산화적 대사능이 높아 산화근섬유로, 2x형과 2b형은 비산화근섬유로

나뉘며 이들 근섬유의 조합비율에 따라 근육 전체의 대사적 특성이 결정된다. 근섬유는 외부 환경 변화에 의해 유형이 전환되는데 근섬유의 조합이 재구성되면 근육 전체의 대사적 특성도 변화한다. 예를 들어 지속적인 운동은 근육 전체의 산화근섬유 비율을 높여 산소호흡을 증가시키고 지방산 산화를 촉진시킨다(Egan et al., 2013). 이와는 반대로 당뇨병이나 비만 환자는 정상인에 비해 적은 양의 산화근섬유를 가지고 있기 때문에(Hickey et al., 1995), 운동이나 비만과 같은 근섬유 유형 전환 자극을 매개하는 분자를 찾는 것은 근육의 기능저하뿐만 아니라 전신 대사질환의 병태생리를 이해하는데 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 근섬유 유형을 변화시키는 분자 기전을 탐색하고 이를 통해 근육과 전신의 대사적 특성을 전환시킬 수 있는 분자를 탐구하였다.

본 연구에서는 근원세포로부터 근세포로 분화할 때 소포체 스트레스가 증가함을 발견하고 이에 따라 증가하는 α 13 단백질을 중심으로 연구하였다. α 13 단백질 발현량이 운동과 비만 등 에너지대사 상태변화에 따라 달라지는 것을 발견하였고, 근세포 선택적 α 13 결손은 근섬유의 에너지대사를 산화대사성 표현형으로 전환시킴을 증명하였다. 이에 대한 기전연구로 α 13과 그 하위 신호인 RhoA-Rock2가 NFATc1의 핵 내 이동을 억제함에 주목하였고, 이로 인해 α 13 결손에 의한 에너지대사 표현형 변화가 나타남을 발견하였다. 나아가 Rock2에 의한 NFATc1의 Ser243 아미노산 잔기 인산화가 활성을 억제함을 규명함으로써 G 단백질 신호 전달체계와 에너지대사 간의 연결고리를 밝혔다.

외부 환경 변화에 따라 근섬유의 유형이 전환되어 근육 전체의 대사적 특성이 변하고(Egan et al., 2013; Hickey et al., 1995), 특히 운동은 근세포 내 중성지방 분해와 혈액으로부터의 지질 흡수를 증가시켜(Kiens and Richter, 1998) 전신 지방 대사를 촉진한다. 운동이나 기타 자극에 따라 근섬유가

산화대사적 표현형으로 전환되면 비만 혹은 당뇨와 같은 관련 대사질환에 저항성을 가진다(Narkar et al., 2008). 본 연구에서 $G\alpha 13$ 의 결손이 체중 증가와 인슐린 감수성에 대해 운동유사적인 유익한 영향을 미침을 보였다. 기존 연구에 의하면 근육의 인슐린 저항성이 간의 그 것보다 선행하고(Samuel and Shulman, 2016), 근육 선택적으로 인슐린 저항성을 발생시킨 유전자 변형 동물들이 야생형에 비해 지방간과 비만에 취약하다(Kim et al., 2000, 2001; Zisman et al., 2000). 이러한 선행 보고는 지방 축적과 인슐린 저항성이 근육뿐만 아니라 간에서도 억제된 본 연구의 결과를 뒷받침한다. 따라서 본 연구에서 주목한 $G\alpha 13$ 은 근육의 유형 전환을 통해 간을 포함한 전신에서의 에너지 대사 속도를 제어하는 것으로 사료된다.

2-2. $G\alpha$ 단백질 연구에 관한 본 연구의 의의

$G\alpha$ 단백질은 G단백질 연결수용체와 리간드의 결합을 인지하여 세포 내로 신호를 전달한다. 따라서 수용체에 결합하는 $G\alpha$ 단백질의 종류에 따라 그 기능이 결정된다. 또한 하나의 수용체에 여러 종류의 $G\alpha$ 단백질이 결합하는 경우가 많아 신호를 매개하는 $G\alpha$ 단백질의 구성비율이 중요하다(Oldham and Hamm, 2008; Rozengurt, 2007). $G\alpha$ 단백질은 서열 유사성에 따라 $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$ 패밀리로 세분화된다. 이들 중에서 $G\alpha_{12}$ 와 $G\alpha_{13}$ 으로 구성된 $G\alpha_{12}$ 패밀리가 가장 최근에 동정되어 현재 암세포의 성장, 분화, 증식, 전이를 촉진함이 규명되었다(Juneja and Casey, 2009; Spiegelberg and Hamm, 2007; Worzfeld et al., 2008). 그러나 광범위한 수용체의 신호를 매개하는 $G\alpha$ 단백질의 특성상 생리적 항상성 유지에도 $G\alpha_{13}$ (혹은 $G\alpha_{12}$) 단백질이 필수적인 역할을 하리라 추론할 수 있다. 그러나 현재까지 정상 세포에서 에너지대사 항상성을 유지하는 신호체계에 미치는 이들의 역할은 전혀 보고된 바가 없다. 특히 근육 생리와 관련하여

Gas의 결손은 근육 양을 감소시키고 산화대사성 근섬유의 비율을 증가시킨다고 알려져 있지만(Chen et al., 2009), 다른 Ga 단백질의 기능에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 따라서 Ga13의 생리적 역할을 규명한 본 연구 결과는 에너지대사 항상성 및 대사질환 제어 기전과 세포 외부자극에 반응하는 골격근의 복잡한 생리를 이해하는데 기여할 것이라 기대된다.

3. 새로운 인산화 신호전달체계 규명

단백질의 인산화는 세포에서 일어나는 거의 모든 현상을 조절하며, 비정상적인 인산화 조절과정은 많은 질병의 원인이 된다(Ubersax and Ferrell, 2007). 매우 많은 수의 기질이 하나의 효소에 의해 탈인산화 되는 것과는 대조적으로 인산화효소는 기질에 대해 높은 선택성을 가진다. 이 때문에 인산화효소는 그 종류가 매우 많으며 다양한 효소-기질 반응을 통해 생명현상을 정밀하게 조절한다. 특히 인산화효소는 기질 결합부위에 경쟁적으로 결합하는 소분자화합물에 의해 특이적으로 억제되는 성질이 있기 때문에 신약개발의 주요 표적으로 여겨지고 있다. 따라서 특정 질병의 발병기전과 치료전략을 탐구하기 위해서는 질병을 조절하는 인산화 반응을 발굴하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 각 세포 모델에서 대사질환을 일으키는 새로운 인산화 신호전달체계를 발굴하여 치료표적을 제시하고 세포 내 신호전달체계에 대한 이해를 넓혔다.

정상세포 모델에서 소포체 스트레스에 의한 hnRNPA1의 감소는 소포체 스트레스가 hnRNPA1의 불안정화에 기여할 가능성을 제시하였고, cycloheximide를 이용한 실험으로 이를 검증하였다. 또한 비접힘단백질반응의 핵심 단백질 중 하나인 PERK가 이 현상을 제어함을 발견하고, 이들 두 단백질이 물리적으로 결합할 수 있음을 발견하였다. 최근 연구결과에 따르면 hnRNPA1의 활성은 각기 다른 인산화 부위를 통해 조절된

다. Akt는 hnRNPA1의 Ser199 잔기를, VRK1은 Ser6 잔기를 인산화하여 각각 활성을 억제하거나 촉진한다(Choi et al., 2012; Jo et al., 2008). PERK는 소포체 스트레스를 인지하는 대표적인 인산화효소이다(Zhang et al., 2006). 그러나 PERK에 의해 인산화되는 기질로는 오직 eIF2 α 와 Nrf2만이 알려져 있다(Cullinan et al., 2003; Harding et al., 1999). 본 연구에서 PERK의 새로운 직접 기질로 hnRNPA1을 제시하고, hnRNPA1의 Thr51 잔기가 인산화되어 단백질의 안정성을 조절함을 밝혔다. 특히 이 부위는 간을 가지고 있지 않은 선충으로부터 인간까지 진화적으로 보존되어 있어 이 현상의 생리적 기능이 간에 국한되지 않을 가능성이 존재한다. 나아가 hnRNPA1의 인산화 잔기는 PERK의 다른 기질과 서열상 유사성을 가지지 않기 때문에, PERK에 의해 인산화되는 다른 기질을 탐색하는 연구에도 기여를 할 것으로 예상된다.

근세포 모델에서 Rock2가 NFATc1을 억제함을 발견하고, 이들 두 단백질의 물리적 결합을 확인하였다. NFATc1은 핵 내 이동 신호가 존재하는 NHR 부위에 여러 개의 인산화 잔기를 가지고 있음이 알려져 있다. 기저 상태의 세포에서 대부분의 세린 잔기가 GSK3, CK1, DYRK와 같은 인산화효소에 의해 인산화되어 있다(Müller and Rao, 2010). 본 연구에서는 Rock2가 NFATc1의 새로운 직접적 인산화효소임을 발견하였고, NFATc1의 Ser243 잔기가 Rock2에 의한 NFATc1 억제를 매개함을 규명하였다. 특히 마우스와 인체 샘플로부터 Ser243 잔기의 인산화가 근육의 대사적인 상태에 따라 변화함을 보여 생체 내에서의 중요성을 제시하였다. 이 인산화 부위는 NHR 부위에 있지만 NFATc1의 CTD 부위도 Rock2와의 결합에 영향을 미치는 것으로 보인다. 실험결과 NFATc1의 NHR 조각뿐만 아니라 CTD 조각도 Rock2와 강한 결합력을 보였다. 기질선택성은 종종 원위결합부(distal docking motif)를 필요로 하는데(Ubersax and Ferrell, 2007),

NFATc1의 CTD가 Rock2와의 반응을 촉진할 가능성이 존재한다. 이는 단백질의 방향과 위치를 인산화에 유리하도록 하거나 NFATc1 주위에 Rock2의 농도를 높임으로써 작용할 것으로 예상된다. 본 연구 결과로부터 근육조직에서는 Rock1이 아닌 Rock2만이 NFATc1을 인산화하여 억제함을 발견하였다. Rock1과 Rock2의 효소활성부위는 높은 서열 유사성을 보이므로(Nakagawa et al., 1996) NFATc1 인산화에 대한 Rock2 선택성에는 이러한 원위결합부가 역할을 할 가능성이 있다. 실제로 Rock1과 Rock2에 차별적으로 인산화되는 기질들이 존재하기 때문에 다양한 세포 모델에서 상반된 생리현상을 나타낸다는 기존 문헌들이 이러한 발견을 뒷받침한다(Mertsch and Thanos, 2014; Noguchi et al., 2007; Shi et al., 2013). 따라서 본 연구에서 발견한 Rock2에 의한 NFATc1 인산화는 Rho-Rock1/2 신호전달체계를 구체화하는 향후 연구에 기여할 것으로 기대된다.

4. 연구결과의 치료적 응용 가능성

간섬유화에 관한 기존 연구에서 TGF β 를 억제하는 치료가 광범위한 항섬유효과를 보임이 알려져 있지만(Rosenbloom et al., 2010), 정상 조직에까지 무차별적으로 TGF β 를 억제하는 것은 부작용을 나타내 치료효과를 반감시킬 수 있다. 본 연구에서는 hnRNPA1를 간섬유화의 새로운 치료 타겟으로 제시하고, 이를 정상세포 선택적으로 발현시키면 질환의 진행이 억제됨을 발견하였다. 이와 같은 방법이나 PERK의 활성을 낮추어 hnRNPA1 안정성을 높일 수 있는 방법을 개발하는 것이 간섬유화를 치료하는 더 안전한 대안이 될 수 있다.

근세포를 이용한 연구를 바탕으로 G α 13이나 이와 연결된 수용체를 억제하는 것은 근육의 미토콘드리아 활성이 저하된 환자의 근육 기능을 회복하는 데에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. Rock2나 NFATc1의

Ser243 인산화에 대한 선택적 억제제는 실제 비선택적 Rock1/2 억제제로 일부 연구된 바(Kanda et al., 2006)처럼 대사질환 치료제 연구에 매력적인 후보물질이 될 수 있다. 또한 본 연구에서 밝힌 $G\alpha 13$ 과 NFATc1의 관계는 대사질환 이외에 다른 질환에도 응용 가능성이 있다. 예를 들어 NFATc1은 암의 발생 및 악성화와 T세포의 기능에 관한 조절 기능이 기존에 연구된 바 있으므로 새롭게 발견한 신호전달체계를 타 질환에 대한 연구 측면에서도 응용 가능할 것이라고 기대한다.

따라서, 본 연구에서 새롭게 발견한 정상세포의 PERK-hnRNPA1-miR-18a-SMAD2 회로와 근세포의 $G\alpha 13$ -Rock2-NFATc1 회로는 세포신호전달 기전에 대한 과학적 지평을 넓히고 대사질환 치료를 위한 새로운 약물작용점을 제시한다.

V. 참고문헌

- Asagiri, M., Sato, K., Usami, T., Ochi, S., Nishina, H., Yoshida, H., Morita, I., Wagner, E.F., Mak, T.W., Serfling, E., et al. (2005). Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med* 202, 1261–1269.
- Chen, M., Feng, H.-Z., Gupta, D., Kelleher, J., Dickerson, K.E., Wang, J., Hunt, D., Jou, W., Gavrilova, O., Jin, J.-P., et al. (2009). Gs deficiency in skeletal muscle leads to reduced muscle mass, fiber-type switching, and glucose intolerance without insulin resistance or deficiency. *AJP Cell Physiol* 296, C930–C940.
- Choi, Y.H., Lim, J.-K., Jeong, M.-W., and Kim, K.-T. (2012). HnRNP A1 phosphorylated by VRK1 stimulates telomerase and its binding to telomeric DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 40, 8499–8518.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., and Diehl, J.A. (2003). Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Mol Cell Biol* 23, 7198–7209.
- DeFronzo, R.A., and Tripathy, D. (2009). Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32 Suppl 2, S157-63.
- Eckel, R.H., Grundy, S.M., and Zimmet, P.Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet* 365, 1415–1428.
- Efeyan, A., Comb, W.C., and Sabatini, D.M. (2015). Nutrient-sensing mechanisms

and pathways. *Nature* 517, 302–310.

Egan, B., Zierath, J.R., Adams, G.R., McCue, S.A., Adams, G.R., Hather, B.M., Baldwin, K.M., Dudley, G.A., Ahlborg, G., Felig, P., et al. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 17, 162–184.

Ehlers, M.L., Celona, B., and Black, B.L. (2014). NFATc1 controls skeletal muscle fiber type and is a negative regulator of MyoD activity. *Cell Rep* 8, 1639–1648.

Feng, B., Yao, P.M., Li, Y., Devlin, C.M., Zhang, D., Harding, H.P., Sweeney, M., Rong, J.X., Kuriakose, G., Fisher, E.A., et al. (2003). The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol* 5, 781–792.

Friedman, S.L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88, 125–172.

Gressner, A.M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., and Dooley, S. (2002). Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7, d793-807.

Guil, S., and Cáceres, J.F. (2007). The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol* 14, 591–596.

Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271–274.

Hickey, M.S., Carey, J.O., Azevedo, J.L., Houmard, J.A., Pories, W.J., Israel, R.G., and Dohm, G.L. (1995). Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 268, E453-457.

Jacob, S., Machann, J., Rett, K., Brechtel, K., Volk, A., Renn, W., Maerker, E., Matthaei, S., Schick, F., Claussen, C.D., et al. (1999). Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 48, 1113–1119.

Jo, O.D., Martin, J., Bernath, A., Masri, J., Lichtenstein, A., and Gera, J. (2008). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates cyclin D1 and c-myc internal ribosome entry site function through Akt signaling. *J Biol Chem* 283, 23274–23287.

Jou, J., Choi, S.S., and Diehl, A.M. (2008). Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 28, 370–379.

Julian, L., and Olson, M.F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) Structure , regulation , and functions. *Small GTPases* 5, 1–12.

Juneja, J., and Casey, P.J. (2009). Role of G12 proteins in oncogenesis and metastasis. *Br J Pharmacol* 158, 32–40.

Kammoun, H.L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T., Ferré, P., and Foulfelle, F. (2009). GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 119, 1201–1215.

Kanda, T., Wakino, S., Homma, K., Yoshioka, K., Tatematsu, S., Hasegawa, K., Takamatsu, I., Sugano, N., Hayashi, K., and Saruta, T. (2006). Rho-kinase as a molecular target for insulin resistance and hypertension. *FASEB J* 20, 169–171.

Kiens, B., and Richter, E.A. (1998). Utilization of skeletal muscle triacylglycerol during postexercise recovery in humans. *Am J Physiol* 275, E332-7.

Kim, J.-H., Han, G.-C., Seo, J.-Y., Park, I., Park, W., Jeong, H.-W., Lee, S.H., Bae,

S., Seong, J., Yum, M.-K., et al. (2016). Sex hormones establish a reserve pool of adult muscle stem cells. *Nat Cell Biol* 18, 930–940.

Kim, J.K., Michael, M.D., Previs, S.F., Peroni, O.D., Mauvais-Jarvis, F., Neschen, S., Kahn, B.B., Kahn, C.R., and Shulman, G.I. (2000). Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest* 105, 1791–1797.

Kim, J.K., Zisman, A., Fillmore, J.J., Peroni, O.D., Kotani, K., Perret, P., Zong, H., Dong, J., Kahn, C.R., Kahn, B.B., et al. (2001). Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of *glut4*. *J Clin Invest* 108, 153–160.

Kim, S.G., Kim, Y.M., Choi, Y.H., Lee, M.G., Choi, J.Y., Han, J.Y., Cho, S.H., Jang, J.W., Um, S.H., Chon, C.Y., et al. (2010). Pharmacokinetics of oltipraz and its major metabolite (RM) in patients with liver fibrosis or cirrhosis: relationship with suppression of circulating TGF-beta1. *Clin Pharmacol Ther* 88, 360–368.

Koo, J.H., Lee, H.J., Kim, W., and Kim, S.G. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatic Stellate Cells Promotes Liver Fibrosis via PERK-mediated Degradation of HNRNPA1 and Upregulation of SMAD2. *Gastroenterology* 150, 181–193.e8.

Krssak, M., Falk Petersen, K., Dresner, A., DiPietro, L., Vogel, S.M., Rothman, D.L., Roden, M., and Shulman, G.I. (1999). Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* 42, 113–116.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.

- Li, L., Shi, J.-Y., Zhu, G.-Q., and Shi, B. (2012). MiR-17-92 cluster regulates cell proliferation and collagen synthesis by targeting TGFB pathway in mouse palatal mesenchymal cells. *J Cell Biochem* 113, 1235–1244.
- Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005a). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1, 361–370.
- Lin, J.H., Walter, P., and Yen, T.S.B. (2008). Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 3, 399–425.
- Lin, W., Harding, H.P., Ron, D., and Popko, B. (2005b). Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma. *J Cell Biol* 169, 603–612.
- Marwarha, G., Dasari, B., and Ghribi, O. (2012). Endoplasmic reticulum stress-induced CHOP activation mediates the down-regulation of leptin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells treated with the oxysterol 27-hydroxycholesterol. *Cell Signal*. 24, 484–492.
- Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 616–630.
- Mederacke, I., Hsu, C.C., Troeger, J.S., Huebener, P., Mu, X., Dapito, D.H., Pradere, J.-P., and Schwabe, R.F. (2013). Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun* 4, 2823.
- Meissner, J.D., Freund, R., Krone, D., Umeda, P.K., Chang, K., Gros, G., and Scheibe, R.J. (2011). phosphorylation of p300 enhances myosin heavy chain I / b gene expression via acetylation of nuclear factor of activated T cells c1. *Nucleic Acids Res* 39, 5907–5925.

- Mertsch, S., and Thanos, S. (2014). Opposing signaling of ROCK1 and ROCK2 determines the switching of substrate specificity and the mode of migration of glioblastoma cells. *Mol Neurobiol* 49, 900–915.
- Michlewski, G., and Cáceres, J.F. (2010). Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1011–1018.
- Müller, M.R., and Rao, A. (2010). NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 10, 645–656.
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K., and Narumiya, S. (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* 392, 189–193.
- Narkar, V.A., Downes, M., Yu, R.T., Embler, E., Wang, Y.-X., Banayo, E., Mihaylova, M.M., Nelson, M.C., Zou, Y., Juguilon, H., et al. (2008). AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell* 134, 405–415.
- Noguchi, M., Hosoda, K., Fujikura, J., Fujimoto, M., Iwakura, H., Tomita, T., Ishii, T., Arai, N., Hirata, M., Ebihara, K., et al. (2007). Genetic and pharmacological inhibition of Rho-associated kinase II enhances adipogenesis. *J Biol Chem* 282, 29574–29583.
- Offermanns, S. (1997). Vascular System Defects and Impaired Cell Chemokinesis as a Result of Galpha 13 Deficiency. *Science* 275, 533–536.
- Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol Cell Biol* 9, 60–71.
- Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J.P., and Fallowfield, J.A. (2014). Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev*

Immunol 14, 181–194.

Perseghin, G., Scifo, P., De Cobelli, F., Pagliato, E., Battezzati, A., Arcelloni, C., Vanzulli, A., Testolin, G., Pozza, G., Del Maschio, A., et al. (1999). Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 48, 1600–1606.

Rangwala, S.M., Wang, X., Calvo, J.A., Lindsley, L., Zhang, Y., Deyneko, G., Beaulieu, V., Gao, J., Turner, G., and Markovits, J. (2010). Estrogen-related receptor gamma is a key regulator of muscle mitochondrial activity and oxidative capacity. *J Biol Chem* 285, 22619–22629.

Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519–529.

Rosenbloom, J., Castro, S. V, and Jimenez, S.A. (2010). Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med* 152, 159–166.

Rozengurt, E. (2007). Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 213, 589–602.

Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest* 126, 12–22.

Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91, 1447–1531.

Shi, J., Wu, X., Surma, M., Vemula, S., Zhang, L., Yang, Y., Kapur, R., and Wei, L. (2013). Distinct roles for ROCK1 and ROCK2 in the regulation of cell detachment.

Cell Death Dis. 4, e483.

Simoneau, J.-A., and Kelley, D.E. (1997). Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol* 83, 166–171.

Spiegelberg, B.D., and Hamm, H.E. (2007). Roles of G-protein-coupled receptor signaling in cancer biology and gene transcription. *Curr Opin Genet Dev* 17, 40–44.

Stevens, R.C., Cherezov, V., Katritch, V., Abagyan, R., Kuhn, P., Rosen, H., and Wüthrich, K. (2013). The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nat Rev Drug Discov* 12, 25–34.

Szendroedi, J., Phielix, E., and Roden, M. (2011). The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 8, 92–103.

Ubersax, J.A., and Ferrell, J.E. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*

Worzfeld, T., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2008). G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease. *Trends Pharmacol Sci* 29, 582–589.

Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J.C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115, 2656–2664.

Yoshida, K., and Matsuzaki, K. (2012). Differential Regulation of TGF- β /Smad Signaling in Hepatic Stellate Cells between Acute and Chronic Liver Injuries. *Front. Physiol* 3, 53.

Zhang, L., Lai, E., Teodoro, T., and Volchuk, A. (2009). GRP78, but not protein-disulfide isomerase, partially reverses hyperglycemia-induced inhibition of insulin

synthesis and secretion in pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 284, 5289–5298.

Zhang, W., Feng, D., Li, Y., Iida, K., McGrath, B., and Cavener, D.R. (2006). PERK EIF2AK3 control of pancreatic beta cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis. *Cell Metab* 4, 491–497.

Zisman, A., Peroni, O.D., Abel, E.D., Michael, M.D., Mauvais-Jarvis, F., Lowell, B.B., Wojtaszewski, J.F., Hirshman, M.F., Virkamaki, A., Goodyear, L.J., et al. (2000). Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* 6, 924–928.

Abstract

Novel molecules in the endoplasmic reticulum stress signaling pathway for the control of metabolic diseases

Ja Hyun Koo

Department of pharmacology, College of pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Endoplasmic reticulum (ER) serves as the central organelle in protein synthesis, maturation, and calcium homeostasis. Excess energy uptake or inflammatory mediators triggers a stress signal in ER which chronically promotes metabolic diseases. Although clinical complications of metabolic disease vary in regard to each organ, disorders or functional failures in liver and skeletal muscle, the major energy-metabolizing organs, shows the earliest onset in general. However, the role of ER stress in liver fibrosis development and consequent chronic liver disease progression are vastly unknown. Moreover, the determinant of metabolic phenotype conversion in skeletal muscle which determines whole body metabolic rate needs to be identified. Many reports support the link between ER stress and metabolic disease. Nonetheless, its pathological mediators which controls disease progression still need to be discovered. Thus, specific aims of this study were to identify novel pathological molecules which mediates ER stress and to specify the mechanisms of 1) liver fibrosis progression by ER stress in terms of hepatic stellate cell transdifferentiation and 2) reprogramming of energy metabolism by ER stress-associated pathological mediator in terms of myofiber transdifferentiation.

First, since hepatic ER stress increased with liver fibrosis progression in patient tissue samples, the role of ER stress in hepatic stellate cell activation was explored. Targeted lentiviral delivery of *Grp78* to HSCs in mice reduced fiber accumulation in liver. Levels of SMAD2, but not SMAD3, were increased in fibrotic liver tissues from patients or mice exposed to ER stress; small interfering RNA-mediated knockdown of SMAD2 reduced ER stress-mediated activation of HSCs. In rat HSCs, ER stress increased levels of SMAD2 messenger RNA by decreasing levels of microRNA-18a (miR-18a), an inhibitor of SMAD2 expression, rather than transactivating the SMAD2 gene. ER stress-activated PERK phosphorylated hnRNPA1, a protein required for the maturational processing of primary miR-18a, at Thr51, accelerating its degradation. Overexpression of hnRNPA1 (or its T51A mutant) in HSCs of mice inhibited liver fibrosis. Severe fibrotic liver tissues from patients had increased levels of phosphorylated PERK and reduced levels of hnRNPA1 in HSCs, compared with mild fibrotic liver tissues. These results suggested ER stress and its novel downstream signal mediator hnRNPA1 as a therapeutic target against liver fibrosis progression.

Secondly, since ER stress was increased in developmental process of myocyte differentiation from myoblast and expressional increase of Ga13 was newly found to be associated in the process, the role of Ga13 in energy metabolic process was then explored. Levels of Ga13 was higher in skeletal muscles of a diabetic patient or high-fat diet fed mice. Conversely, Ga13 expression was suppressed following a single bout of exercise. Skeletal muscle-specific Ga13 knockout mouse showed significantly greater oxidative fiber proportion in the muscle, with higher mitochondrial biogenesis and cellular respiration compared to wild-type. NFATc1, a chief regulator of myofiber type conversion, was suppressed by Ga13 and its

downstream effector RhoA and mediated most of the effect of $G\alpha 13$ on myofiber conversion, as revealed by *in vivo* delivery of NFATc1 shRNA. Mechanistically, Rock2 downstream of $G\alpha 13$ -RhoA, phosphorylated NFATc1 at Ser243 to inhibit its transcriptional activity. Ser243 phosphorylation of NFATc1 was reduced after exercise, but was higher in obese animals or diabetic patients. Consequently, $G\alpha 13$ deletion in muscles enhanced whole-body energy metabolism and increased insulin sensitivity, thus affording protection from diet-induced obesity and hepatic steatosis. The results define $G\alpha 13$ as a switch regulator of myofiber reprogramming, implying modulations of $G\alpha 13$ or associated receptors and downstream pathways may provide an innovative strategy to improve muscle metabolic function, on patients with metabolic disease.

Collectively, it is newly revealed that 1) PERK phosphorylation of hnRNPA1 mediates ER stress-induced hepatic stellate cell transdifferentiation and that 2) Rock2 phosphorylation of NFATc1 mediates metabolic transdifferentiation of myofibers triggered by ER stress-associated signal mediator $G\alpha 13$. The results suggest the pathophysiological influences of ER stress and its mediators in the major metabolic organs liver and muscle and thus warrant further scientific exploration and a possible avenue for pharmaceutical interventions against diseases.

Keywords: ER stress, metabolic disease, liver fibrosis, obesity, diabetes, hepatic stellate cell, myofiber

Student number: 2010-21662